

JONAS JÄGER FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
GEMINIVÍRUS ASSOCIADOS AO TOMATEIRO
NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

JONAS JÄGER FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE GEMINIVÍRUS
ASSOCIADOS AO TOMATEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 30 de novembro de 2001

Profª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Conselheira)

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

**À minha esposa Aparecida,
Aos meus filhos Henrique e Leonardo,
pelo amor, carinho, e ajuda.**

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Vivo, pela saúde e o direcionamento na caminhada pelo mundo terreno.

À minha família, pela compreensão em relação à minha grande ausência no convívio familiar devido às muitas horas de estudo e de trabalho no laboratório e na casa-de-vegetação, pela paciência e, pelo apoio para realização deste treinamento.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela liberação por tempo integral e a CAPES pela concessão de bolsa de estudos para o meu treinamento em nível de doutorado.

Aos Professores Murilo Geraldo de Carvalho e Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela oportunidade de ingressar no Curso de Doutorado em Fitopatologia – UFV.

Pelo apoio técnico, reagentes, equipamentos e outros materiais disponibilizados para execução deste trabalho, concedidos pelos seguintes responsáveis financeiros de projetos de pesquisa: Prof. Murilo Zerbini, Prof. Murilo Carvalho, Prof^a. Elizabeth Fontes, Prof. Sérgio Brommonshenkel, Prof. Laércio Zambolim, Dra Eunize Maciel, Prof^a. Elza, e Prof. Acelino.

A minha gratidão especial, ao Prof. Laércio Zambolim e a Dra Eunize Maciel pelo incentivo e apoio, desde as fases iniciais até a conclusão deste

treinamento, incluindo a permissão para trabalhar com fitovírus no Laboratório de Cultura de Tecidos e Marcadores Moleculares do Cafeeiro, localizado no BIOAGRO.

A todos os professores que direta e indiretamente contribuíram para este treinamento.

Aos professores da banca de defesa de tese pelas sugestões, em particular ao Prof. Murilo Zerbini, pelo acompanhamento e avaliação das correções antes e após a defesa.

Aos funcionários, ‘Fizinho’, Délio, Cecília e Joaquim, pelas ajudas e lembretes tão importantes.

Pela ajuda oportuna, dos colegas Eduardo, Renata, Virgínia, Fabrício, Raquel, Adriana e Claudine.

A todos os colegas dos laboratórios Cultura de Tecido e Marcadores Moleculares do Cafeeiro, Virologia Vegetal Molecular e, Patologia Florestal e Marcadores Moleculares, pelas muitas horas de convívio e relacionamento amigo.

Aos colegas professores de Uberlândia, pelo apoio durante a fase final de conclusão do treinamento, em especial aos colegas Luiz Ricardo Goulart Filho, Fernando Juliatti, Maria Amélia dos Santos, Armando Takatsu, e Afonso M. Brandão.

À Igreja Presbiteriana de Viçosa, por acolher e apoiar nossa família, num convívio intenso e constante.

A todos que, direta e indiretamente, colaboram para este treinamento e a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JONAS JÄGER FERNANDES, filho de Jonas Fernandes Reis e Elisa Jäger Fernandes, nasceu em Uberlândia, MG, em 12 de agosto de 1958.

Em dezembro de 1982, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em dezembro de 1985, obteve o título de Mestre em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, área de concentração em Fitovirologia.

De janeiro de 1986 a dezembro de 1989 atuou nas áreas de pesquisa agrícola, extensão rural, e ensino superior.

Em dezembro de 1989 ingressou na Universidade Federal de Uberlândia, na carreira de professor da área de fitopatologia, onde permanece até a presente data.

Em março de 1997, iniciou o curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração Virologia Vegetal Molecular, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2001.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Taxonomia da família <i>Geminiviridae</i>	5
2.2. Características moleculares	6
2.3. Replicação do genoma viral	10
2.4. Movimento viral	12
2.5. Transmissão natural de geminivírus.....	15
2.6. Gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas	16
2.7. Recombinação e pseudo-recombinação	20
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE GEMINIVÍRUS PRESENTES NO COMPLEXO VIRAL TGV-Ub1	23
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Coleta, transmissão e manutenção do complexo viral	26
2.2. Purificação biológica de geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1	28
2.3. Caracterização biológica do complexo viral TGV-Ub1.....	28
2.4. Caracterização molecular dos geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1	30
2.4.1. Clonagem de forma replicativa	30

2.4.2. Caracterização dos clones obtidos	31
2.4.3. Seqüenciamento dos componentes genômicos completos.....	32
2.4.4. Descrição dos subclones obtidos.....	33
2.5. Análise filogenética.....	35
2.6. Obtenção de clones correspondentes a repetições parciais do genoma viral.....	35
2.7. Avaliação da infectividade dos clones.....	38
2.8. Caracterização biológica do TRMV	39
2.8.1. Transmissão via extrato vegetal tamponado.....	39
2.8.2. Gama de hospedeiros.....	40
2.8.3. Inoculação em <i>Solanum tuberosum</i> e <i>Datura stramonium</i> por enxertia.....	40
2.8.4. Detecção de componentes genômicos do TRMV em hospedeiros alternativos.....	40
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Purificação biológica dos geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1	42
3.2. Caracterização biológica do complexo viral TGV-Ub1	46
3.2.1. Gama de hospedeiros.....	46
3.2.1.1. Inoculação via extrato vegetal tamponado (EVT).....	46
3.2.1.2. Inoculação por enxertia.....	53
3.3. Caracterização molecular do complexo viral TGV-Ub1	57
3.3.1. Clonagem de forma replicativa e seqüenciamento parcial dos clones obtidos.....	57
3.3.2. Seqüenciamento dos componentes genômicos completos	59
3.4. Análise filogenética.....	71
3.5. Caracterização dos demais clones obtidos.....	73
3.6. Análise da infectividade dos genomas clonados.....	82
3.7. Caracterização biológica do TRMV	89
3.7.1. Transmissão do TRMV via extrato vegetal tamponado (EVT).....	89
3.7.2. Transmissão do TRMV por enxertia para <i>Solanum tuberosum</i> e <i>Datura stramonium</i>	93
3.7.3. Gama de hospedeiros	94
3.7.3.1. Plantas inoculadas via EVT	94
3.7.3.2. Plantas inoculadas por enxertia.....	97
3.7.4. Detecção dos componentes genômicos do TRMV em hospedeiros alternativos.....	97
4. DISCUSSÃO.....	101

CAPÍTULO 2	
DIVERSIDADE GENÉTICA DE GEMINIVÍRUS ASSOCIADOS AO TOMATEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO	114
1. INTRODUÇÃO	114
2. MATERIAL E MÉTODOS	122
2.1. Coleta de amostras.....	122
2.2. Extração do DNA viral e PCR	123
2.3. Análise de “Southern blot”	125
2.4. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP	125
3. RESULTADOS.....	127
3.1. Detecção de geminivírus em tomateiros na região do Triângulo Mineiro	127
3.2. Análise da diversidade genética com base na amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR	129
3.3. Análise da diversidade genética com base em hibridização molecular	129
3.4. Análise da diversidade genética com base em PCR-RFLP.....	131
4. DISCUSSÃO.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144

RESUMO

FERNANDES, Jonas Jäger, D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. **Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Um complexo viral causando mosaico dourado e deformação (rugosidade) foliar em tomateiros na região do Triângulo Mineiro, MG, Brasil, foi obtido por meio de moscas brancas virulíferas, e denominado TGV-Ub1. Os vírus presentes neste complexo viral foram transmitidos via extrato vegetal tamponado (EVT) a partir de folhas de tomateiro para plantas de *Nicotiana benthamiana*. A análise via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* indicou a amplificação de dois fragmentos distintos para o componente A e para o componente B, sugerindo que o complexo viral TGV-Ub1 é composto por dois vírus distintos. De fato, dois geminivírus foram purificados biologicamente a partir do complexo viral TGV-Ub1, e causaram em tomateiro sintomas de mosaico dourado suave, sem rugosidade. O complexo viral TGV--Ub1 infectou apenas plantas da família *Solanaceae*, incluindo várias espécies de *Nicotiana* e *Solanum tuberosum*, e excluindo *S. melongena*, *S. gilo*, *Capsicum annuum* e *C. frutescens*. Obtiveram-se 87 clones com cerca de 2.600 nucleotídeos a partir de folhas de tomateiro infectado pelo complexo viral

TGV-Ub1. A comparação das seqüências completas de nucleotídeos dos clones pUb1-49 (DNA-A), pUb1-62 e pUb1-81 (ambos DNA-B) indicou que esses componentes pertencem a novos begomovírus. Com base em análise filogenética, esses componentes foram classificados como pertencente a um begomovírus do hemisfério ocidental. Os clones pUb1-49 e -81 possuem regiões comuns idênticas. Este vírus foi denominado *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). O clone pUb1-62 possui região comum distinta do TRMV e de todos os demais geminivírus descritos. O DNA-A cognato de pUb1-62 não foi encontrado. Clones contendo 1,5 cópia dos componentes genômicos clonados em pUb1-49, -62 e -81 foram construídos. A análise da infectividade desses clones em ‘Santa Clara’ e em *N. benthamiana*, por meio de bombardeamento de partículas, demonstrou que a combinação dos clones correspondentes ao genoma do TRMV causou sintomas sistêmicos nos dois hospedeiros, semelhantes àqueles causados pelos isolados puros obtidos neste trabalho. A combinação dos clones pUb1-49 e -62 não resultou em infecção sistêmica, indicando que esses dois componentes não formam pseudo-recombinantes viáveis. O TRMV foi transmitido via EVT a partir de folhas de *N. benthamiana* para *N. benthamiana*, e, por enxertia para *S. tuberosum* e *Datura stramonium*. Amostras de tomateiro apresentando sintomas semelhantes a mosaico dourado foram coletadas em três municípios da região do Triângulo Mineiro. Análise via PCR indicou que 148 das 170 amostras coletadas estavam infectadas por begomovírus. Das amostras infectadas, apenas uma hibridizou a 68°C com sonda para o componente A do TRMV, 109 hibridizaram a 58°C com esta sonda e 39 não hibridizaram com esta sonda em nenhuma das duas temperaturas, indicando que a maioria das amostras continha geminivírus geneticamente relacionado ao TRMV. Os componentes TRMV-A e TRMV-B foram detectados, respectivamente, em plantas de *Nicandra physaloides* (joá de capote) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) coletadas em lavouras de tomateiro. Análise genética baseada em PCR-RFLP de fragmentos amplificados a partir das amostras coletadas indicou a existência de um alto grau de diversidade genética de begomovírus em tomateiros da região do Triângulo Mineiro.

ABSTRACT

FERNANDES, Jonas Jäger, D.S. Universidade Federal de Viçosa, November 2001. **Characterization and genetic diversity of geminiviruses associated with tomato plants in the region of Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Committee Members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A viral complex causing golden mosaic and leaf distortion (rugosity) in tomato plants in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais, Brasil, was obtained from viruliferous whiteflies, and named TGV-Ub1. This viral complex was sap-transmitted from tomato leaves to *Nicotiana benthamiana* plants. PCR amplification using universal primers for the genus *Begomovirus* yielded two distinct fragments for the A and B components of the viral genome. This suggested that the TGV-Ub1 complex was composed of two distinct viruses. Indeed, two geminiviruses were biologically purified from the TGV-Ub1 complex, and shown to cause symptoms of mild golden mosaic with no rugosity on tomato plants. The TGV-Ub1 complex infected only plants in the *Solanaceae*, including several *Nicotiana* species and *Solanum tuberosum*, but excluding *S. melongena*, *S. gilo*, *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. Eighty-seven clones corresponding to full-length (~2.600 nucleotides) viral genomes were obtained from tomato leaves infected with TGV-Ub1. Comparisons of the complete

nucleotide sequences of clones pUb1-49 (DNA-A), pUb1-62 and pUb1-81 (both DNA-B) indicated that they comprise new begomoviruses. By phylogenetic analysis, these components were identified as belonging to a begomovirus from the western hemisphere. Clones pUb1-49 and -81 showed identical common regions. This virus was named *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). Clone pUb1-62 has a distinct common region from TRMV and all other known geminiviruses. A cognate DNA-A for pUb1-62 was not found. Clones containing 1.5 copies of the genomic components cloned in pUb1-49, -62 and -81 were constructed. Infectivity analysis of these clones in ‘Santa Clara’ and *N. benthamiana* plants using particle bombardment demonstrated that the combination of clones corresponding to the TRMV genome resulted in systemic symptoms in both hosts. These symptoms were analogous to those observed when using the pure isolates obtained in this study. The combination of pUb1-49 and -62 did not result in systemic infection, indicating that these two components do not form viable pseudo-recombinants. TRMV was sap-transmitted from *N. benthamiana* leaves to *N. benthamiana* plants, and by grafting to *S. tuberosum* and *Datura stramonium*. Samples from tomato plants showing symptoms similar to golden mosaic were collected in three different municipal districts in the region of Triângulo Mineiro. PCR analysis indicated that 148 out of 170 collected samples were infected with a begomovirus. From these infected samples, only one hybridized at 68°C to a specific probe for the DNA-A of TRMV. However, 109 samples hybridized at 58°C to the same probe. Thirty-nine samples did not hybridize to this probe at either temperature. These results indicated that most of the samples contained geminiviruses genetically related to TRMV. TRMV-A and TRMV-B were detected, respectively, in plants of *Nicandra physaloides* and *Phaseolus vulgaris* growing naturally nearby tomato fields. A genetic analysis based on PCR-RFLP from fragments obtained from collected samples demonstrated the existence of a high degree of genetic diversity of begomoviruses in tomato plants cultivated in the region of Triângulo Mineiro.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) está entre as hortaliças mais consumidas do mundo. O Brasil é o nono produtor mundial e o maior produtor da América Latina, com 2,6 milhões de toneladas por ano (FAO, 1998). Minas Gerais é o segundo estado da federação em produção, com uma área plantada em 1994 de 6.454 ha e produção de 297 mil toneladas (IBGE, 1995).

Várias doenças de natureza viral contribuem significativamente para a redução da produtividade do tomateiro, destacando-se na literatura nacional as viroses causadas por *Tomato spotted wild virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Potato virus Y* (PVY) e *Tomato yellow top virus* (TYTV) (LOPES e SANTOS, 1994; RESENDE e CUPERTINO, 1996; KUROZAWA e PAVAN, 1997; FAJARDO et al., 2000). Em anos recentes, uma alta incidência de geminivírus vem sendo relatada na cultura do tomateiro no Brasil (ANÔNIMO, 1996; FAJARDO et al., 2000; FARIA et al., 2000).

Desde sua caracterização como vírus de DNA na década de 1970, os geminivírus têm sido reconhecidos por causarem doenças sérias e freqüentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (GOODMAN, 1977; HARRISON et al., 1977). Mais de 60 geminivírus diferentes já foram identificados, e cerca de 12 infectam o tomateiro (BRIDDON e MARKHAM, 1995). Os geminivírus mais

importantes economicamente são o *African cassava mosaic virus* (ACMV), o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e o *Maize streak virus* (MSV), os três primeiros transmitidos por mosca-branca e o último transmitido por cigarrinha (FAUQUET e FARGETTE, 1990; BROWN e BIRD, 1992; THOTTAPPILLY, 1992).

O primeiro relato mundial de geminivírus causando doença em tomateiro ocorreu no início da década de 1960, no Brasil, quando FLORES et al. (1960) observaram a incidência de “clorose infecciosa das malváceas” em tomateiros no estado de São Paulo, e realizaram estudos de transmissão do vírus causador desta enfermidade do tomateiro para *Sida* sp. e vice-versa. Posteriormente, em 1975, COSTA et al. descreveram seis geminivírus causando mosaico dourado em tomateiro no estado de São Paulo. As partículas de um desses vírus foram purificadas, e o vírus foi denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (MATYIS et al., 1975). Na época, a incidência de mosaico dourado em tomateiro foi atribuída à migração da mosca-branca vetora (*Bemisia tabaci*) e a existência de reservatórios naturais, com maior incidência do TGMV em lavouras de tomate industrial nos meses de outono (COSTA, 1976).

O TGMV apresenta ampla distribuição nas áreas tropicais do Brasil (BUCK e COUTTS, 1985), mas até o início dos anos 90 a incidência desse geminivírus em tomateiro não era significativa no país (POLSTON e ANDERSON, 1997). Entretanto, nos últimos sete anos houve um aumento significativo na ocorrência de doenças causadas por geminivírus em tomateiro nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco, Goiás e no Distrito Federal, com perdas de produção variando de 40 a 100% (RIBEIRO et al., 1994; REZENDE et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; ZERBINI et al., 1996; BEZERRA et al., 1997; FARIA et al., 1997; BEZERRA et al., 1998; SANTOS et al., 1998). O surgimento e a incidência destes vírus em tomateiro tem sido associados à introdução e rápida disseminação no Brasil do biótipo B de *Bemisia tabaci* (LOURENÇÃO e NAGAI, 1994; FRANÇA et al., 1996; HAJI et al., 1996; RIBEIRO et al., 1998).

Em Minas Gerais, no ano de 1996, a ocorrência de geminivírus em tomateiro foi registrada em duas localidades distantes entre si em aproximadamente 500 km: o município de Igarapé, no cinturão verde de Belo Horizonte, e o município de Uberlândia, na região do Triângulo Mineiro (REZENDE et al., 1996; ZERBINI et al., 1996). O estudo do isolado coletado em Igarapé demonstrou tratar-se de uma nova espécie de geminivírus, denominada *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV) (AMBROZEVÍCIUS, 2000). Durante esse trabalho, a autora detectou a existência de outra provável espécie de geminivírus infectando o tomateiro no estado de Minas Gerais, no município de Bicas. Em relação ao complexo viral encontrado em Uberlândia, o seqüenciamento parcial do DNA viral clonado a partir da amplificação de fragmentos do genoma via PCR indicou tratar-se de uma nova espécie de geminivírus (ZERBINI et al., 1996). Trabalhando com amostras de tomateiro coletadas na região do Triângulo Mineiro, REZENDE et al. (1997) sugeriram, com base em análise do polimorfismo conformacional de fita simples em tampão de baixa força iônica (LIS-SSCP) do DNA de geminivírus amplificado a partir das amostras coletadas, a existência de infecções mistas, com mais de uma variante de geminivírus infectando a mesma planta. Esse tipo de análise, entretanto, não é capaz de distinguir se essas variantes constituem espécies distintas ou estirpes de uma mesma espécie.

As perdas causadas pela infecção com o complexo de geminivírus de Uberlândia (provisoriamente denominado TGV-Ub1) em cultivos protegidos de tomateiro podem atingir 90% da produção de frutos (FILGUEIRA et al., 1996). Os efeitos da infecção também são visíveis na parte aérea da planta. Tomateiros inoculados com o TGV-Ub1 via mosca-branca aos 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a germinação das plantas apresentaram uma redução significativa no crescimento de folhas e do caule (GONÇALVES et al., 1997). A incidência da virose em condições de campo em Araguari, MG, durante o plantio das águas em 1996, avaliada com base na observação de sintomas típicos de infecção por geminivírus (mas sem confirmação via PCR ou outro método que detecte o vírus na planta) foi da ordem de 2,5 a 50% (PEIXOTO et al., 1996).

O manejo das doenças causadas por geminivírus em tomateiro é difícil e dispendioso. O manejo regional certamente será baseado no controle do inseto vetor e, onde for possível, na redução de fontes de inóculo. O uso de inseticidas é uma das estratégias mais utilizadas e mais dispendiosas para o manejo de geminivirose (POLSTON e ANDERSON, 1997). Além disso, o controle químico da mosca-branca vetora é problemático devido à baixa sensibilidade de *Bemisia tabaci* à maioria dos inseticidas em uso, e à rápida seleção de populações resistentes aos produtos mais utilizados (PICÓ et al., 1996).

O uso de cultivares tolerantes ou resistentes é a estratégia mais promissora para o controle dessas doenças (PICÓ et al., 1996). Entretanto, a obtenção de cultivares resistentes requer um grande esforço e demanda tempo. Por exemplo, o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus, é um dos patógenos virais mais devastadores em tomateiro em todas as regiões onde ocorre (esse vírus ainda não foi relatado no Brasil). Durante os últimos 20 anos, foi realizado um esforço considerável para desenvolver cultivares resistentes ao TYLCV. A ausência de resistência no tomateiro cultivado obrigou os melhoristas a transferirem genes de resistência encontrados em acessos de origem selvagem (principalmente *Lycopersicon peruvianum*). Além desse problema, o progresso do melhoramento para resistência ao TYLCV tem sido lento porque a herança da resistência é complexa (LAPIDOT et al., 1997). Por fim, a alta variabilidade de isolados de TYLCV de diferentes regiões geográficas também contribuiu para que a obtenção de cultivares resistentes de tomateiro demande muito tempo (PICÓ et al., 2000).

Assim, considerando-se o alto grau de severidade das doenças causadas por geminivírus transmitidos por mosca-branca na cultura do tomateiro no Brasil e a ausência de informações detalhadas a respeito dos agentes etiológicos, realizou-se o presente trabalho com os objetivos de: (a) caracterizar biológica e molecularmente o complexo de geminivírus TGV-Ub1, coletado em tomateiro no município de Uberlândia, Minas Gerais; e (b) analisar a diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia da família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada por possuir material genético composto por DNA de fita simples (ssDNA), circular, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidado por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros, formando dois icosaedros incompletos, com cerca de 18×30 nm, que dão um aspecto geminado ao vírion (LAZAROWITZ, 1992; BRIDDON e MARKHAM, 1995). A família *Geminiviridae* foi reconhecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 1995 (BRIDDON e MARKHAM, 1995).

Com base em gama de hospedeiros, especificidade de vetor e organização de genoma, a família *Geminiviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* (anteriormente denominados Subgrupos I, II e III, respectivamente) e *Topocuvirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Os mastrevírus incluem geminivírus transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae), com o genoma organizado em apenas uma molécula de DNA e que infectam monocotiledôneas [com exceção do *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) na Austrália e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) na

África do Sul, que infectam dicotiledôneas (LIU et al., 1997)]. O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo.

O gênero *Curtovirus* é constituído por geminivírus que infectam dicotiledôneas, são transmitidos por cigarrinhas, e possuem um único componente genômico. Dificilmente são transmitidos mecanicamente, mas possuem ampla gama de hospedeiros. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo. O BCTV possui uma gama de hospedeiros muito ampla, infectando mais de 300 espécies em 44 famílias de plantas.

O gênero *Begomovirus* é o mais numeroso. Todos os begomovírus infectam dicotiledôneas, são transmitidos por mosca-branca (*Bemisia* spp., Homoptera:Aleyrodidae), possuem gama de hospedeiros relativamente restrita, e a maioria possui dois componentes genômicos, à exceção de alguns isolados de TYLCV. Cada componente, com aproximadamente 2.600 nucleotídeos, é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas partículas para que ocorra infecção sistêmica. O *Bean golden mosaic virus* (BGMV) é a espécie-tipo deste gênero.

No sétimo relatório do ICTV (VAN REGENMORTEL et al., 2000) foi incluído um quarto gênero na família *Geminiviridae*, denominado *Topocuvirus*. O único membro do gênero é o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que possui um componente genômico e é transmitido por cigarrinhas (Homoptera: Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. Este novo gênero foi criado com base na organização do genoma e no relacionamento filogenético com outras espécies de geminivírus.

2.2. Características moleculares

A organização do genoma da maioria dos begomovírus está representada na Figura 1.

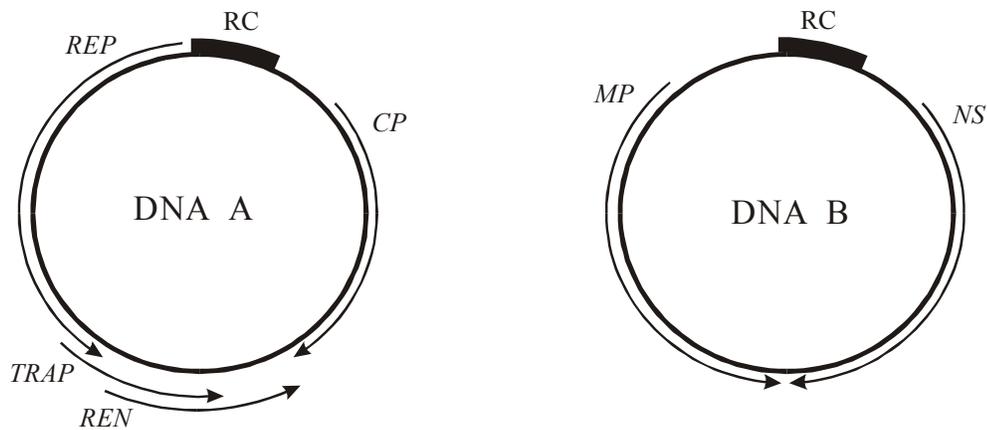


Figura 1 - Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *REP*, “replication-associated protein”; *TRAP*, “trans-activating protein”; *REN*, “replication-enhancer protein”; *CP*, gene da proteína capsial (“coat protein”); *MP*, “movement protein”; *NS*, “nuclear shuttle”. A região comum (RC) também está indicada.

A grande maioria das espécies de begomovírus contém dois componentes genômicos, designados A e B, cada um constituído por uma molécula de ssDNA com 2.500 a 2.800 nucleotídeos. O componente A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o componente B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (TIMMERMANS et al., 1994). A presença de ambos os componentes é necessária para a infecção sistêmica (STANLEY, 1983). Os componentes A e B não possuem homologia de seqüência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia) (LAZAROWITZ, 1992). A partir desta região intergênica divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (STANLEY e GAY, 1983; HOWARTH et al., 1985).

Nos begomovírus, o componente A codifica de quatro a seis proteínas: uma proteína essencial para a replicação (REP, “replication-associated protein”, anteriormente AC1 ou AL1); uma proteína transativadora (TRAP, “trans-activating protein”, anteriormente AC2 ou AL2), fator de transcrição atuando *in trans* nos promotores dos genes de sentido viral (*CP* e *NS*); a proteína REN (“replication-enhancer protein”, anteriormente AC3 ou AL3), fator de amplificação da replicação viral; e a proteína capsidial (CP, “coat protein”, anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). O componente B codifica as proteínas MP (“movement protein”, anteriormente BC1 ou BL1) e NS (“nuclear shuttle”, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus, por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

Mutagênese *in vitro* e expressão em plantas transgênicas demonstraram que a proteína REP é a única proteína viral essencial para a replicação (HAYES e BUCK, 1989; HANLEY-BOWDOIN et al., 1990). O componente B não tem autonomia de replicação (DAVIES et al., 1987). A proteína REP não é considerada uma replicase, mas está associada à replicação do DNA, com propriedades de ligação específica a DNA de fita simples e dupla (FONTES et al., 1992), clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas (LAUFS et al., 1995) e hidrólise de ATP (DESBIEZ et al., 1995). A proteína REP é uma proteína multifuncional, que atua na regulação da replicação e transcrição do DNA viral (EAGLE et al., 1994; SUNTER et al., 1993). REP age na forma de multímeros, com domínios responsáveis pela oligomerização da proteína, ligação ao DNA e clivagem do DNA (OROZCO et al., 1997). O sítio de ligação para REP é requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação, mas também para regulação negativa da transcrição do gene *REP* (EAGLE et al., 1994). Outra função da proteína REP é a de induzir, indiretamente, a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro em células

totalmente diferenciadas, criando um ambiente que permite uma eficiente replicação viral (NAGAR et al., 1995).

A função do produto do gene *REN* é aumentar a eficiência da replicação de uma maneira vírus não-específica, porém esta função não é essencial (MORRIS et al., 1991). A replicação do TGMV, na ausência de *REN*, é reduzida em cerca de 50 vezes (SUNTER et al., 1990). Experimentos realizados por SETTLAGE et al. (1996) demonstraram que ocorre interação entre as proteínas *REP* e a *REN*, com a formação de oligômeros funcionais responsáveis pelo aumento da eficiência da replicação viral. Esses autores sugerem que a estrutura do complexo *REP-REN* é mais importante para iniciar o processo de replicação do que a atividade catalítica de *REN*.

A ORF *AC4* se encontra inserida dentro do gene *REP*, mas é codificada em uma fase de leitura distinta. Essa ORF possui o potencial de codificar uma proteína de 10 kDa. GRONING et al. (1994) demonstraram, por meio de experimentos de expressão transiente, que *AC4* do TGMV provavelmente reprime a expressão de *REP* através da regulação negativa do promotor *AL61* do gene *REP*. Esta repressão é independente do sítio de ligação para *REP*, pois um cassete de expressão em plantas codificando *AC4* foi capaz de reprimir o gene da luciferase sob o comando do promotor *AL61* cuja região de ligação a *REP* havia sido deletada (EAGLE e HANLEY-BOWDOIN, 1997). Outros autores (POOMA e PETTY, 1996) questionam se a ORF *AC4* é realmente expressa pelo TGMV e outros geminivírus, já que mutações em *AC4* não resultaram em mudanças fenotípicas e ainda não foi encontrada uma função para *AC4* no processo infeccioso.

A proteína capsidial (*CP*) é necessária para a infecção sistêmica de alguns geminivírus e dispensável para a maioria dos outros (QIN et al., 1998). Outra função da *CP* parece estar relacionada à movimentação célula-a-célula do vírus e transmissão pelo vetor (MULLINEAUX et al., 1984; HÖFER et al., 1997a). BRIDDON et al. (1990) demonstraram que a troca do gene *CP* do ACMV, transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do BCTV, transmitido por cigarrinha, resultou na alteração de especificidade do inseto

vetor. A conformação correta da proteína capsidial e seu papel na transmissão pelo vetor são controlados pelos aminoácidos 129 e 134 (NORIS et al., 1998).

A ORF AV1 (“pre-coat”) está presente somente em geminivírus do “Velho Mundo” e parece estar associada ao movimento sistêmico do vírus. Plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com DNA infeccioso do TYLCV contendo mutações no gene *AV1* desenvolveram sintomas moderados de infecção viral e apresentaram baixo acúmulo de DNA viral, tanto de fita simples quanto de fita dupla. Porém, protoplastos inoculados com essa mesma construção apresentaram acúmulo normal de DNA viral, sugerindo que AV1 está envolvida no movimento sistêmico do vírus (PADIDAM et al., 1996).

Para que o DNA dos begomovírus se movimente célula-a-célula há necessidade da interação entre as proteínas NS e MP. Este modelo de movimento intracelular foi desenvolvido a partir de estudos com o BDMV e o SqLCV (NOUEIRY et al., 1994; PASCAL et al., 1994). ROJAS et al. (1998) demonstraram que as proteínas MP e NS de BDMV interagem diretamente com o DNA viral, reconhecendo-o com base na sua forma e tamanho.

2.3. Replicação do genoma viral

O sítio de replicação dos geminivírus está localizado no núcleo das células infectadas, e a replicação do genoma viral é quase totalmente dependente da maquinaria de replicação de DNA do hospedeiro, o que faz com que os geminivírus sejam modelos ideais para o estudo da replicação de DNA e regulação de expressão gênica em plantas. Esse fato possibilitou um grande acúmulo de informações sobre a biologia molecular destes vírus.

As partículas virais acumulam-se exclusivamente no núcleo, na forma de agregados irregulares ou arranjos cristalinos hexagonais (KIM et al., 1978). Os geminivírus replicam o seu genoma circular de fita simples de DNA por meio de um intermediário de fita dupla (forma replicativa, RF), utilizando um mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13

(SAUNDERS et al., 1991; STANLEY, 1995). Nestes fagos, proteínas do hospedeiro convertem a fita simples de DNA em fita dupla, que é amplificada e serve como molde para transcrição e síntese do DNA de fita simples (REVINGTON et al., 1989). No caso dos geminivírus não se sabe exatamente como ocorre essa conversão, mas todas as evidências indicam que ela também é realizada por fatores do hospedeiro (NAGAR et al., 1995). Em mastrevírus já foi identificado um “primer” que poderia ser o iniciador da síntese da fita complementar, mas o mesmo ainda não foi encontrado para outros geminivírus (DONSON et al., 1984).

Na replicação dos begomovírus, a fita complementar de DNA serve de molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que formam uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários (multímero ou concatômero). O multímero é clivado gerando monômeros (os DNAs genômicos), que serão ligados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsulados formando os vírions (LAZAROWITZ, 1992; TIMMERMANS et al., 1994; LAUFS et al., 1995). A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum (RC) entre os dois componentes genômicos. A *ori* possui uma organização modular, com pelo menos três módulos funcionais caracterizados por FONTES et al. (1994). A seqüência de nucleotídeos da RC é altamente conservada para uma determinada espécie viral, mas variável entre diferentes espécies de vírus, com exceção de um elemento de 30 nucleotídeos essencial para a replicação (LAZAROWITZ, 1992). Este elemento, contendo uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo (“stem and loop”) com uma seqüência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus (DAVIES et al., 1987; LAZAROWITZ, 1992) e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (OROZCO e HANLEY-BOWDOIN, 1998). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT/AC) essencial para o início do processo de replicação por círculo rolante (STANLEY, 1995). A clivagem é realizada pela

proteína REP, que funciona como uma endonuclease sítio-específica, com requerimento de estrutura e seqüência (LAUFS et al., 1995; OROZCO e HANLEY-BOWDOIN, 1998). Dentro da RC existem também seqüências que funcionam como determinantes da replicação, como o sítio de ligação a REP (FONTES et al., 1992; FONTES et al., 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II, responsável pela transcrição dos genes virais.

O geminivírus mais bem estudado quanto à replicação é o TGMV. Este vírus codifica duas proteínas que atuam na replicação, REP e REN. A RC do TGMV inclui repetições em ordem direta de seqüências específicas de cinco nucleotídeos, separadas entre si por três nucleotídeos, onde se liga REP (FONTES et al., 1994). A síntese da fita positiva se inicia na estrutura conservada em forma de grampo, o SCE (OROZCO et al., 1998). O sítio de ligação de REP ao DNA do TGMV está localizado 34 pares de bases (pb) a 5' deste (variável de 23 a 82 pb para outros geminivírus), entre a caixa TATA do gene *REP* e a SCE (ARGÜELLO-ASTORGA et al., 1994a,b; OROZCO et al., 1998). A ligação de REP ao seu sítio de reconhecimento, de forma seqüência-específica, é necessária para a auto-regulação negativa de sua própria expressão (EAGLE et al., 1994). Após a ligação de REP ao DNA viral e estabilização do complexo formado por REP e REN (SETTLAGE et al., 1996), a proteína cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (LAUFS et al., 1995).

2.4. Movimento viral

O movimento de vírus de plantas pode ser visto como a combinação de dois processos: (a) movimento local, constituindo o movimento do vírus ou DNA viral entre células, e (b) movimento a longa distância, através do sistema vascular (TIMMERMANS et al., 1994). A entrada do vírus na via de transporte a longa distância é crítica para o estabelecimento da infecção sistêmica, e a incapacidade de um vírus em atingir o floema pode resultar em sintomas fracos ou atenuados,

ou mesmo na resistência do hospedeiro à infecção (LUCAS e GILBERTSON, 1994).

Os geminivírus se distinguem dos demais vírus de plantas por apresentarem duas proteínas essenciais para o movimento célula-a-célula. A proteína MP é responsável pelo aumento do limite de exclusão e transporte através dos plasmodesmas, e a proteína NS é responsável pelo transporte do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma (NOUEIRY et al., 1994; PASCAL et al., 1994). A proteína NS provavelmente transporta o DNA viral através dos poros da membrana nuclear, a via normal de importação/exportação utilizada por proteínas, RNAs e ribonucleoproteínas celulares (CARRINGTON et al., 1996).

NOUEIRY et al. (1994) demonstraram, por meio de estudos de microinjeção, que a proteína NS do BDMV intermedia o tráfego de ssDNA e dsDNA do núcleo para o citoplasma, enquanto MP aumenta o limite de exclusão dos plasmodesmas permitindo a passagem de dsDNA. O movimento dos begomovírus requer ação cooperativa entre NS e MP, e essas proteínas podem atuar *in trans* mesmo entre espécies não relacionadas como o TGMV e o BGMV (SCHAFFER et al., 1995). A função das proteínas MP e NS no transporte célula-a-célula tem sido confirmada por meio de ensaios bioquímicos de interação proteína: DNA e determinação da localização subcelular dessas proteínas (NOUEIRY et al., 1994; PASCAL et al., 1994; SANDERFOOT et al., 1996; SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1996).

Resultados obtidos por SANDERFOOT e LAZAROWITZ (1995), por meio de ensaios de expressão transiente de MP e NS do SqLCV em células de inseto e em protoplastos de tabaco, sugerem que estas proteínas agem de forma cooperativa a fim de facilitar o movimento do ssDNA do seu sítio de replicação no núcleo para a periferia da célula, e em seguida através da parede celular a fim de infectar as células adjacentes. Este modelo sugere que o complexo NS-ssDNA se desloca até a periferia da célula e, com o auxílio de MP, atinge as células vizinhas.

Trabalhos realizados por ROJAS et al. (1998), por meio da expressão das proteínas de movimento do BDMV *in vitro* e análise de géis de retardamento,

mostraram que NS e MP ligam-se preferencialmente a dsDNA circular de maneira dependente da forma e comprimento, e que MP liga-se a dsDNA com maior afinidade que NS. Baseado nestes resultados, estes autores sugerem um modelo de movimento em que há transferência do DNA de NS para MP, seguido do movimento célula-a-célula do complexo MP-DNA.

O movimento a longa distância ocorre via floema, entretanto ainda persiste a controvérsia a respeito da forma transportada (ss/dsDNA livre ou vírions). Derivados do DNA-A de ACMV e TGMV carregando insertos exógenos reverteram para o tipo selvagem (Brough et al., 1988; Etessami et al., 1988 citados por LAZAROWITZ, 1992), o que sugere limitações induzidas por etapas de empacotamento, favorecendo a hipótese de movimento na forma de vírions. Entretanto, a proteína capsidial é dispensável para o movimento sistêmico da maioria dos begomovírus (QIN et al., 1998), indicando que a formação de vírions não é necessária para o movimento. Além disso, os resultados obtidos por ROJAS et al. (1998) indicam que MP e NS reconhecem o DNA viral com base em sua forma e comprimento (número de nucleotídeos), o que eliminaria a necessidade de empacotamento e explicaria a reversão de mutantes contendo porções extras de DNA.

POOMA et al. (1996), baseado em estudos com mutações no gene *CP* do TGMV e do BGMV e inoculação em diferentes hospedeiros, sugerem que a CP poderia desempenhar um papel auxiliar na movimentação sistêmica do vírus e propõe a existência de três tipos de movimento: movimento local (célula-a-célula), que não requer a proteína capsidial, utilizando NS e MP para atravessar a membrana nuclear e plasmodesmas, respectivamente; movimento sistêmico independente da proteína capsidial, que ocorreria em hospedeiros aos quais o vírus é bem adaptado; e movimento sistêmico dependente da proteína capsidial, que ocorreria em relações de pouca adaptação entre vírus e hospedeiro.

2.5. Transmissão natural de geminivírus

A incidência de geminivírus sob condições naturais é determinada primariamente pelas limitações epidemiológicas impostas à mosca-branca e às cigarrinhas vetoras (FRISCHMUTH e STANLEY, 1993). A transmissão dos geminivírus ocorre de modo circulativo. Os períodos de aquisição, latência, de retenção e de inoculação são variáveis para diferentes combinações vírus-vetor. Muitos geminivírus requerem um período latente de quatro horas ou mais, e são retidos no vetor por vários dias, possivelmente por todo o ciclo de vida do vetor. A transmissão e o período de aquisição dependem da concentração viral na seiva da planta (TIMMERMANS et al., 1994). Mais recentemente, verificou-se que a associação do TYLCV com adultos de mosca-branca causa uma redução significativa na expectativa de vida e na oviposição das fêmeas, sugerindo que o TYLCV possui um certo grau de patogenicidade ao inseto (RUBINSTEIN e CZOSNEK, 1997). Outra evidência deste tipo de relação entre o TYLCV e a mosca-branca é a provável passagem transovariana do vírus de uma geração de mosca-branca para a outra (GHANIM et al., 1998). Entretanto, a replicação do TYLCV no vetor ainda não foi demonstrada de forma definitiva.

A transmissão de vírus circulativos envolve a passagem das partículas virais através da parede do intestino do inseto para a hemolinfa, daí para a glândula salivar e finalmente da saliva para outras plantas (TIMMERMANS et al., 1994). A especificidade da transmissão de geminivírus por mosca-branca parece ser determinada pela passagem da hemolinfa para a glândula salivar (COHEN et al., 1989). A especificidade vírus-vetor parece ser determinada por ambos, vírus e vetor. Entre os produtos codificados pelo vírus, a proteína capsidial é o único que participa na determinação da especificidade do vetor (TIMMERMANS et al., 1994). Evidências dessa participação vem de estudos envolvendo a troca da região codificadora da proteína capsidial do ACMV pela do BCTV: o vírus quimérico é transmitido pela cigarrinha vetora do BCTV, *Circulifer tenellus*, mas não pela mosca-branca transmissora do ACMV (BRIDDON et al., 1990).

2.6. Gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas

O ciclo de infecção celular de vírus de plantas pode ser dividido em fases da replicação do genoma e de movimento intercelular. Cada uma delas requer a interação entre componentes virais e do hospedeiro. Tais interações podem incluir o recrutamento de fatores e da maquinaria celular do hospedeiro para a multiplicação e disseminação do vírus (PETTY et al., 2000), e também a supressão de mecanismos de defesa antiviral (VOINNET et al., 1999). A eficiência coletiva destas várias interações em um dado hospedeiro define as propriedades do vírus, e pode ser considerada como uma medida da adaptação do vírus ao hospedeiro (PETTY et al., 2000).

Estudando a resistência das cultivares Othello e Black Turtle Soup T-39 de *Phaseolus vulgaris* ao BDMV, WANG et al. (1999) determinaram que esta resistência envolve o bloqueio do transporte a longa distância, e que apenas na cultivar Othello existe associação entre a resistência e a reação de hipersensibilidade (HR). Estes autores também verificaram que o determinante desta HR está associado ao componente B do BDMV. GARRIDO-RAMIREZ et al. (2000) estabeleceram que este determinante de HR está localizado na proteína NS, e que esta proteína também tem papel de fator de avirulência na interação do BDMV com a cultivar de feijoeiro Black Turtle Soup T-39. Estes últimos autores verificaram que ao inocularem o BDMV via biobalística em radículas do feijoeiro, o vírus se multiplicou e moveu célula-a-célula nas células corticais, mas não ocorreu movimento viral a longa distância. Segundo estes autores, as plantas desenvolvidas a partir destas plântulas inoculadas não desenvolveram sintomas de infecção viral sistêmica. A análise via PCR não detectou a presença de DNA viral nas folhas do feijoeiro inoculado na radícula. Portanto, as cultivares Othello e Black Turtle Soup T-39 são hospedeiras do BDMV, mas elas não apresentam infecção sistêmica devido à resistência ao movimento viral que apresentam contra este vírus.

Caracterizando a resistência de plantas de pimentão (*Capsicum annuum*) ao *Pepper huasteco virus* (PHV), GODINEZ-HERNANDEZ et al. (2001)

observaram quatro plantas que não apresentaram sintomas de infecção viral até três meses após a inoculação via biobalística ou por enxertia. Analisando as folhas inoculadas via PCR, os autores concluíram que o PHV pode se replicar nestas plantas, e que a ausência de infecção sistêmica do PHV nestas plantas assintomáticas é devida à restrição ao movimento viral.

A gama normal de hospedeiros de vários geminivírus pode ser alterada experimentalmente por mutações que causam a inativação de determinado gene viral ou a substituição de aminoácidos em proteínas codificadas pelo vírus (INGHAM e LAZAROWITZ, 1993; INGHAM et al., 1995; HALEY et al., 1995; JUPIN et al., 1994; LIU et al., 1998). Entretanto, PETTY et al. (2000) afirmam que fenótipos de perda de função que restringem a gama de hospedeiros podem ocorrer devido a interações imperfeitas entre fatores virais, ou seja, esses fenótipos podem não estar necessariamente relacionados com a adaptação das proteínas virais ao hospedeiro. Este efeito é evidente no comportamento de pseudo-recombinantes. Esses pseudo-recombinantes freqüentemente exibem adaptação reduzida aos hospedeiros dos vírus parentais, e também apresentam redução na gama de hospedeiros (FRISCHMUTH et al., 1997; HÖFER et al., 1997b; HILL et al., 1998).

Estudando a infecção do TGMV e do BGMV, dois begomovírus estreitamente relacionados, PETTY et al. (1995) concluíram que o BGMV pode infectar sistemicamente *N. benthamiana*, embora seja menos adaptado a este hospedeiro do que o TGMV. Objetivando entender quais as características do genoma viral requeridas para a adaptação dos begomovírus aos seus hospedeiros, PETTY et al. (2000) analisaram um conjunto variado de vírus recombinantes entre o TGMV e o BGMV. Os recombinantes foram criados pela substituição independente ou combinada das seqüências de nucleotídeos das ORFs correspondentes aos genes *TRAP*, *REN*, *NS* e *MP*, e das regiões não codificadoras *ARi* e *BRi*, localizadas entre a região comum e os genes *CP* e *NS*, respectivamente, considerando como unidade mínima de replicação as seqüências de nucleotídeos da região comum de cada componente do genoma viral, o gene *REP*, e a região não-codificadora *BLi*, localizada entre a região

comum e o gene *MP*. Os fenótipos dos vírus recombinantes foram analisados em *N. benthamiana* e em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), hospedeiros aos quais o TGMV e o BGMV são, respectivamente, bem adaptados. Com os resultados obtidos, estes autores concluíram que a análise independente de qualquer uma das seqüências permutadas apresenta um efeito similar, pequeno ou desprezível na adaptação do genoma viral ao hospedeiro, e que este efeito não depende do genoma viral analisado. Entretanto, quando houve a permuta combinada de todas as ORFs e regiões não-codificadoras (NCRs), o fenótipo observado era dependente do genoma viral analisado. No caso do recombinante criado com base na unidade mínima de replicação do BGMV e as ORFs e NCRs do TGMV, observou-se que as seqüências do TGMV e suas respectivas proteínas foram capazes de conferir melhor adaptação à *N. benthamiana*. Este recombinante reproduziu substancialmente a sintomatologia e a replicação do TGMV tipo selvagem. Além disto, o recombinante manteve a propriedade de alta infectividade específica em feijoeiro do BGMV tipo selvagem. Em contraste, o recombinante com base na unidade mínima de replicação do TGMV e as ORFs e NCRs do BGMV apresentou apenas ganho parcial de função em feijoeiro. Esse recombinante foi menos adaptado do que o BGMV em ambos os hospedeiros testados. Os autores acreditam que a falta de adaptação do recombinante com a unidade mínima de replicação do TGMV pode ter sido causada por interações imperfeitas entre seqüências específicas do vírus. Entretanto, os papéis de outras regiões do genoma do BGMV para adaptação ao feijoeiro não foram excluídos. Considerando o conjunto destes resultados, estes autores concluíram que a adaptação de begomovírus ao hospedeiro é determinada cooperativamente com base em seqüências codificadoras e não codificadoras do genoma viral.

Utilizando hibridização “*in situ*”, MORRA e PETTY (2000) demonstraram que o TGMV e o BGMV diferem significativamente em suas habilidades de saírem das células do floema em direção ao mesófilo em folhas de *N. benthamiana* infectadas sistemicamente. O TGMV apresentou tropismo em direção às células do mesófilo e capacidade de infectar este tecido, enquanto o BGMV permaneceu confinado às células do floema de folhas infectadas

sistemicamente. De acordo, as plantas de *N. benthamiana* infectadas com o TGMV manifestaram sintomas de infecção sistêmica, enquanto as plantas desta hospedeira infectadas com o BGMV foram assintomáticas. Segundo estes autores, as diferenças de tropismo entre o TGMV e o BGMV em folhas de *N. benthamiana* infectadas sistemicamente são geneticamente determinadas por três regiões do genoma viral: a região não codificadora BRi e a região das ORFs correspondentes aos genes *AL23* ou *BL1/BR1*. A região não codificadora BRi, localizada entre a região comum e o gene *NS*, foi essencial para o fenótipo de tropismo do TGMV das células do floema para as células do mesófilo. Além disto, os resultados destes autores forneceram fortes evidências de que a eficiência do movimento célula-a-célula contribui diretamente para a invasão do mesófilo foliar a partir do sistema vascular em folhas infectadas sistemicamente. As análises genéticas dos vírus sugeriram o requerimento de um nível crítico da proteína BR1 para que ocorra eficientemente a invasão do mesófilo foliar. Os autores observaram ainda que a inoculação via biobalística do BGMV tipo selvagem diretamente nas células do mesófilo foliar de *N. benthamiana* resultou em lesões cloróticas, indicando que ocorreu a infecção destas células por este vírus. Conseqüentemente, a expressão da proteína BR1 nestas células permite o movimento célula-a-célula do BGMV neste tecido. Este fato e outras observações genéticas levaram MORRA e PETTY (2000) a considerar que possivelmente existem diferenças importantes no nível de expressão do gene *BR1* em algum tipo específico de célula do sistema vascular, a partir da qual se inicia a invasão do mesófilo, e não propriamente na expressão deste gene em células do próprio mesófilo foliar. Segundo estes autores, o efeito da quantidade da proteína BR1 em sua atividade de transporte pode ser explicado pela competição entre o transporte do vírus e os transportadores normais da célula em relação ao acesso à maquinaria endógena de transporte intra e intercelular.

2.7. Recombinação e pseudo-recombinação

Uma característica marcante dos begomovírus é a sua rápida adaptação a novos hospedeiros, refletida no surgimento de novas estirpes ou mesmo espécies de begomovírus que ocorre após a introdução de um novo vírus em determinada região geográfica, ou quando a introdução do inseto vetor permite que begomovírus presentes em determinadas espécies de plantas infectem outras espécies. Essa rápida adaptação e evolução de begomovírus indica que mecanismos de geração de diversidade genética são freqüentes e eficientes nesses vírus. Uma vez que a replicação do genoma viral é realizada pela maquinaria celular do hospedeiro, é improvável que simples mutações pontuais causadas por erros da DNA polimerase sejam responsáveis pela diversidade genética dos begomovírus. Outros mecanismos, como a recombinação ou a pseudo-recombinação (possível apenas quando o vírus possui mais de um componente genômico, o caso da grande maioria dos begomovírus), devem atuar. De fato, a análise comparativa de um grande número de seqüências de nucleotídeos de espécies e estirpes de begomovírus demonstrou que sua evolução não ocorre apenas gradualmente, via mutação pontuais, mas também por eventos freqüentes de recombinação entre espécies do gênero ou mesmo entre espécies de gêneros distintos dentro da família *Geminiviridae* (STANLEY et al., 1986; BRIDDON et al., 1996; PADIDAM et al., 1999). A troca de componentes genômicos completos (pseudo-recombinação) entre isolados relacionados (STANLEY et al., 1985; ARIA et al., 1994) ou, mais raramente, entre espécies distintas (GILBERTSON et al., 1993; HOU e GILBERTSON et al., 1996; HÖFER et al., 1997b; HILL et al., 1998) também contribui de forma significativa para a diversidade genética dos geminivírus.

A recombinação e a pseudo-recombinação são possibilitadas pela ocorrência freqüente de infecções mistas (LAZAROWITZ, 1991; HARRISON et al., 1997; HARRISON e ROBINSON, 1999; ROYE et al., 1999). Além disto, seqüências de begomovírus também podem se integrar no genoma de planta, inclusive nas células germinativas, possibilitando sua transmissão vertical e,

conseqüentemente, criando oportunidades para a ocorrência de outros eventos de recombinação (BEJARANO et al., 1996; ASHBY et al., 1997). Esta habilidade de trocar material genético facilita a diversificação genética destes vírus (PADIDAM et al., 1999).

NAVAS-CASTILHO et al. (2000) analisaram as seqüências de nucleotídeos de diferentes isolados de begomovírus de tomateiro na Espanha, e registraram evidências que suportam a ocorrência de recombinação natural entre o TYLCV-Is e o ToLCV. Em 1999, PADIDAM et al. já haviam determinado evidências estatísticas de que esta recombinação havia ocorrido.

Em Uganda, a análise de plantas de mandioca naturalmente infectadas demonstrou diferentes combinações de DNA-A e DNA-B de begomovírus (PITA et al., 2001). Os resultados sugeriram a ocorrência natural de pseudo-recombinantes inter e intraespecíficos e um aumento na complexidade do mosaico dourado ocorrendo em mandioca na Uganda, resultando em epidemia severa. Também foram detectadas infecções mistas de ACMV-UG e *East african cassava mosaic virus*, isolado da Uganda (EACMV-UG) em mandioca e em mosca-branca na maioria das regiões onde os vírus ocorrem. As amostras com infecções mistas sempre mostraram sintomas mais severos, sugerindo interação sinérgica entre o ACMV-UG e o EACMV-UG. A estimativa da quantidade de DNA viral em plantas naturalmente infectadas demonstrou que em infecções mistas a quantidade de DNA de cada um desses vírus era maior do que a quantidade de DNA viral em infecções isoladas. Os resultados também demonstraram claramente que o mosaico dourado da mandioca pode ser causado pelo pseudo-recombinante formado pelo DNA-A do EACMV-UG2 e o DNA-B do EACMV-UG3.

O potencial de recombinação dos geminivírus em produzir novos vírus também foi verificado em infecções naturais em plantas daninhas. O mosaico amarelo do *Ageratum conyzoides* é causado por um complexo viral que inclui um begomovírus com apenas um componente genômico, o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) (TAN et al., 1995), um DNA satélite com replicação autônoma, denominado DNA 1, provavelmente originado de nanovírus (SAUNDERS e

STANLEY, 1999), um pequeno DNA semelhante ao DNA satélite, denominado DNA- β , e outras moléculas pequenas de DNA (SAUNDERS et al., 2000). O DNA 1 não tem função essencial no fenótipo da doença, e a origem do DNA- β ainda não foi determinada. Este DNA- β não possui homologia de seqüência com begomovírus, mas possui várias características em comum com o componente B destes vírus, as quais provavelmente refletem convergência na evolução entre estes dois tipos de componentes (SAUNDERS et al., 2001). A agroinoculação de plantas de *Ageratum conyzoides* com AYVV isoladamente causou infecção assintomática desta hospedeira com uma baixa quantidade de DNA presente nas plantas. A manifestação de sintomas suaves de mosaico amarelo nesta hospedeira foi observada quando a agroinoculação foi realizada com um plasmídeo recombinante contendo a combinação do AYVV e do DNA- β *recDNA- β 17*. Este resultado indicou a necessidade dos dois componentes para a ocorrência de mosaico amarelo em *Ageratum conyzoides*. As plantas com infecção mista entre estes dois componentes apresentaram conteúdo de DNA significativamente maior do que com a infecção isolada do AYVV. Os autores verificaram experimentalmente que o AYVV e o DNA- β podem se recombinar após a transmissão pela mosca-branca, produzindo quimeras semelhantes ao *recDNA- β 17*. Os autores acreditam que estes eventos de recombinação provavelmente ocorrem em alta frequência e, conseqüentemente, que os recombinantes estão normalmente associados à doença no campo.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE GEMINIVÍRUS PRESENTES NO COMPLEXO VIRAL TGV-Ub1

1. INTRODUÇÃO

Considerando os geminivírus que infectam tomateiro no Brasil e utilizando critérios de gama de hospedeiros e sintomatologia, COSTA et al. (1975) descreveram seis viroses diferentes, todas transmitidas por “mosca-branca”. Um aspecto comum entre os agentes etiológicos causadores destas doenças é a infecção de *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* L. ‘Turkish NN’, *L. esculentum*, *Datura stramonium*, *Physalis angulata*, *P. floridana*, *P. fuscumaculata* e *P. dubescena*. Entretanto, apenas a virose denominada mosaico dourado do tomateiro ou “chita” era transmissível via extrato vegetal tamponado. O agente causador desta virose foi parcialmente caracterizado por MATYIS et al. (1975) como sendo um geminivírus, denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV).

COSTA e CARVALHO (1960) relataram que o *Abutilon mosaic virus* (AbMV), comum em malváceas, e o *Euphorbia mosaic virus* (EMV), presente

em *Euphorbia prunifolia* no Brasil, são capazes de infectar o tomateiro quando transmitidos por mosca-branca (*B. tabaci* Genn.). As plantas de tomateiro são mais suscetíveis ao EMV do que ao AbMV. Plantas de tomateiro infectadas pelo EMV apresentam clareamento de nervuras, mosaico amarelo, forte rugosidade, enrugamento e nanismo acentuados. Os sintomas induzidos por AbMV incluem mosaico verde-claro ou amarelado, com as áreas amareladas mais extensas do que no caso de infecção pelo EMV. Contudo, os outros sintomas causados por AbMV são menos intensos do que os causados pelo EMV. Estes autores também registram que o EMV foi transmitido via extrato vegetal tamponado para *D. stramonium* e *Euphorbia prunifolia*, e o AbMV para *Malva parviflora* e *Nicandra physaloides*. Contudo, os autores afirmam que raramente as doenças causadas por estes vírus em tomateiro são encontradas em campo.

A partir de 1994, no Brasil, um número significativo de novas espécies de geminivírus infectando o tomateiro foi caracterizado pelo seqüenciamento de nucleotídeos da região N-terminal do gene da proteína capsidial (RIBEIRO et al., 1994; REZENDE et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; ZERBINI et al., 1996; BEZERRA et al., 1997; FARIA et al., 1997; BEZERRA et al., 1998; SANTOS et al., 1998). Os trabalhos destes autores registram um aumento significativo na ocorrência de doenças causadas por geminivírus em tomateiro em seis estados brasileiros.

O *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), relatado no Estado de São Paulo, foi transmitido por mosca-branca a partir de tomateiros para *Datura stramonium*, *Physalis* sp., *Nicotiana tabacum* ‘Turkish’, *Phaseolus vulgaris* ‘Preto’, *Sida micrantha*, *S. rhombifolia*, *Solanum tuberosum* ‘Bintje’, ‘Achat’, ‘Monalisa’, ‘Spunta’, ‘Baraka’, ‘Atlantic’ e ‘Itararé’ (FARIA et al., 1997; SOUZA-DIAS et al., 1996). Segundo SOUZA-DIAS et al. (1996), o TYVSV não é transmitido via extrato vegetal tamponado.

Em Minas Gerais, em 1996, registrou-se a ocorrência de geminivirose em tomateiro nos municípios de Uberlândia e Igarapé, nas regiões do Triângulo Mineiro e o cinturão verde de Belo Horizonte, respectivamente (REZENDE et al., 1996; ZERBINI et al., 1996). As perdas causadas pela infecção com o

complexo de geminivírus de Uberlândia (provisoriamente denominado TGV-Ub1) em cultivos protegidos de tomateiro podem atingir 90% da produção de frutos (FILGUEIRA et al., 1996). Os efeitos da infecção também são visíveis na parte aérea da planta. Tomateiros inoculados com o complexo TGV-Ub1 via mosca-branca aos 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a germinação das plantas apresentaram uma redução significativa no crescimento de folhas e do caule (GONÇALVES et al., 1997). A incidência da virose em Araguari, MG, durante o plantio de verão em 1996, avaliada com base na observação de sintomas típicos de infecção por geminivírus (mas sem confirmação via PCR ou outro método que detecte o vírus na planta) foi da ordem de 2,5 a 50% (PEIXOTO et al., 1996).

Trabalhando com amostras de tomateiro coletadas na região do Triângulo Mineiro, REZENDE et al. (1997) sugeriram, com base em análise do polimorfismo conformacional de fita simples em tampão de baixa força iônica (LIS-SSCP) do DNA de geminivírus amplificado a partir das amostras coletadas, a existência de infecções mistas, com mais de uma variante de geminivírus infectando a mesma planta. Esse tipo de análise, entretanto, não é capaz de distinguir se essas variantes constituem espécies distintas ou estirpes de uma mesma espécie.

A primeira parte deste trabalho teve como objetivo geral a caracterização biológica e molecular de geminivírus coletados em tomateiro na região do Triângulo Mineiro, por meio dos seguintes objetivos específicos: (a) clonagem do genoma de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro e determinação da seqüência de nucleotídeos dos clones obtidos; (b) análise da organização do genoma e determinação da relação filogenética dos geminivírus clonados, entre si e com outros geminivírus descritos na literatura; e (c) determinação da gama de hospedeiros do complexo viral TGV-Ub1 e dos geminivírus clonados, e comparação com outros geminivírus previamente caracterizados no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, transmissão e manutenção do complexo viral

Moscas-brancas coletadas em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivado em casa-de-vegetação no município de Uberlândia, e apresentando sintomas típicos de virose (REZENDE et al., 1996), foram transferidas para plântulas de tomateiro ‘Ângela Hipper’, em condições isoladas de outras fontes de insetos. As plantas que receberam os insetos foram observadas quanto à reprodução dos sintomas da virose. As plantas que desenvolveram sintomas de infecção viral e a colônia de moscas-brancas que se estabeleceu com as moscas coletadas, provavelmente *Bemisia tabaci* biótipo B (FERNANDES et al., 1997), foram utilizadas para manter o complexo de geminivírus em condições isoladas, em Uberlândia, MG, de abril de 1996 a janeiro de 1997. Em janeiro de 1997, tomateiros novos foram submetidos a um período de acesso de inoculação por moscas-brancas virulíferas de 3 a 4 dias. Em seguida, os insetos adultos foram removidos mecanicamente e as plântulas transferidas para gaiolas em câmara de crescimento a 35°C na Universidade Federal de Viçosa.

A confirmação da infecção por geminivírus foi obtida por meio da amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR, utilizando os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1c496, específicos para o componente A, e

PCRc1 e PBL1v2040, específicos para o componente B (ROJAS et al., 1993). Esses oligonucleotídeos amplificam um fragmento com aproximadamente 1.400 nucleotídeos para o componente A, compreendendo parte do gene *REP*, toda a região comum, e parte do gene *CP*, e de 500 nucleotídeos para o componente B, compreendendo parte do gene *NS* até o primeiro nucleotídeo da região comum.

A reação de PCR foi preparada em um volume de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 3,5 mM ou 2,5 mM para os componentes A ou B, respectivamente, dNTPs a 0,2 mM, 0,3-0,8 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 5 a 10 µl de DNA molde. Para amplificação do fragmento do componente A, a mistura foi incubada por um período inicial de 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Para amplificação do fragmento do componente B, a mistura foi incubada inicialmente por 1 minuto a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador MJ RESEARCH modelo PTC 100. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização por 5 minutos a 72°C. A amplificação foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7 a 1,4%) corado com brometo de etídeo.

Uma vez confirmada a infecção por geminivírus, este complexo viral, denominado TGV-Ub1 (*Tomato geminivirus* - Uberlândia 1) foi preservado *in vitro* e *in vivo*, e utilizado no desenvolvimento deste trabalho. Para preservação do complexo viral TGV-Ub1 *in vitro*, folhas de plantas infectadas apresentando sintomas foram colhidas, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em ultracongelador (-80°C). Para a preservação *in vivo* do complexo viral, o ápice de plantas infectadas foi enxertado, pela técnica de enxertia de topo, em plântulas da cultivar Santa Clara, com duas a três folhas definitivas. As plantas enxertadas foram mantidas em telado. As enxertias

foram repetidas a cada quatro a seis meses para manutenção *in vivo* do complexo viral durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

2.2. Purificação biológica de geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1

Ápices de plantas da cultivar Santa Clara infectadas com o TGV-Ub1 foram enxertados em plantas da cultivar Miller Early com 2 a 4 folhas definitivas. As plantas enxertadas foram observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas. Paralelamente, as plantas foram analisadas quanto à amplificação de uma ou duas bandas de DNA viral via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus (item 2.1). As plantas a partir das quais se amplificou apenas um fragmento de DNA foram selecionadas e mantidas em telado.

Alternativamente, plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas via extrato vegetal tamponado (EVT) com o complexo viral TGV-Ub1 e apresentando sintomas de infecção viral foram analisadas via PCR, para seleção de plantas a partir das quais se amplificou apenas um fragmento de DNA viral. Essas plantas foram selecionadas, enxertadas em plantas de tomateiro sadias da cultivar ‘Santa Clara’ e mantidas em telado até que desenvolvessem sintomas de infecção viral e fossem analisadas para amplificação de DNA viral via PCR. Os tomateiros comprovadamente infectados foram identificados e mantidos em telado.

2.3. Caracterização biológica do complexo viral TGV-Ub1

A caracterização biológica consistiu em teste de gama de hospedeiros, utilizando-se espécies de plantas de *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Fabaceae*, *Chenopodiaceae* e *Amaranthaceae*, incluindo *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’, ‘Ângela Hipper’, ‘Miller Early Pack’ e ‘Rutgers’,

Capsicum annuum, *Capsicum frutescens*, *Solanum gilo*, *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum*, *Nicandra physaloides*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* ‘Xanthi’, ‘Havana 425’, ‘Sansum’, ‘White Burley’, ‘Turkish’ e ‘TNN’, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana clevelandii*, *Solanum nigrum*, *Cucurbita pepo* ‘Caserta’, *Gossypium hirsutum* ‘DeltaPine Acala 90’, *Sida rhombifolia*, *Phaseolus vulgaris* ‘Emgopa Ouro 201’, ‘Preto 153’, ‘Santana’ e ‘Carioca 80’, *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*.

As plantas foram inoculadas via enxertia e via EVT, a partir de folhas de *N. benthamiana* com sintomas de infecção pelo TGV-Ub1, maceradas em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v). Em cada ensaio a inoculação por EVT foi repetida 3 a 4 vezes, em dias alternados.

Para a inoculação via EVT foram realizados quatro ensaios. O primeiro, um ensaio preliminar, foi realizado em agosto de 1997 incluindo espécies de *Solanaceae* e *Fabaceae*. Os outros três ensaios foram realizados no segundo semestre de 2000. Dois deles incluíram espécies de todas as famílias testadas e o outro incluiu quase exclusivamente espécies de *Solanaceae*. Em cada ensaio foram inoculadas de 7 a 11 plantas de cada espécie/cultivar testada, além de duas plantas controle, não inoculadas. A inoculação via enxertia incluiu a enxertia de uma ou mais espécie/cultivar em cada teste realizado. Em cada teste a enxertia foi realizada com 2 a 13 repetições por espécie/cultivar, e o teste repetido pelo menos uma vez. Em ambos os ensaios (transmissão via EVT ou enxertia) as plantas foram mantidas em telado e observadas quanto ao surgimento de sintomas até 30 a 45 dias após a inoculação. A fim de confirmar os resultados obtidos com a avaliação visual, foi feita a extração do DNA de acordo com o método de DELLAPORTA et al. (1983), a partir de discos foliares retirados de folhas novas (não-inoculadas), de todas as plantas inoculadas ou de plantas selecionadas. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação de fragmentos genômicos virais via PCR.

2.4. Caracterização molecular dos geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1

2.4.1. Clonagem de forma replicativa

A forma replicativa (RF) foi extraída de acordo com o método de GILBERTSON et al. (1991) e armazenada a -20°C . Após extração, foi determinado o padrão enzimático de restrição, a fim de identificar uma ou mais enzimas que clivassem o DNA viral em um único ponto, linearizando-o e permitindo a sua clonagem no vetor. A clivagem do DNA viral foi realizada com *Bam*HI, *Bgl*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Sst*I, *Xba*I e *Xho*I. Como controle, foram utilizados RF não-clivado e RF clivado pela enzima *Mung bean nuclease*, que cliva apenas DNA de fita simples. Após clivagem, o DNA foi separado por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%). O DNA foi transferido para membrana de náilon e hibridizado com as sondas TGV-BZ-A-*Xho*I (DNA-A) e TGV-Ub1-B24-*Xho*I (DNA-B) (Quadro 1) marcadas com $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP pela técnica de oligonucleotídeos aleatórios (SAMBROOK et al., 1989).

Após a identificação das enzimas que linearizavam a RF, esta foi extraída a partir de 2 gramas de folíolos congelados de tomateiro ‘Santa Clara’ infectado por enxertia com o TGV-Ub1, e clivada com as enzimas apropriadas a 37°C por 10 minutos a 2 horas. Imediatamente após a clivagem, o produto da ação enzimática foi separado em gel de agarose (0,7%) e a RF linearizada foi purificada do gel utilizando-se o kit “Sephaglass Bandprep” (Pharmacia Biotech), conforme as recomendações do fabricante. O plasmídeo pBLUESCRIPT II KS+ (pKS+, Stratagene Inc.) foi linearizado com a mesma enzima e purificado por meio de adição de igual volume de fenol-clorofórmio (1:1) e precipitação com 1/20 vols. de acetato de sódio 0,3 M, pH 5,5 e 2,5 vols. de etanol absoluto. Após centrifugação e lavagem com etanol 70% (v/v), o DNA foi seco ao ambiente e solubilizado em Tris-HCl 10 mM, pH 8,3. A RF linearizada foi ligada ao sítio correspondente do plasmídeo pKS+, de acordo com técnicas padronizadas (SAMBROOK et al., 1989).

Quadro 1 - Sondas utilizadas nos experimentos de hibridização molecular

Sonda	Região do genoma viral reconhecida	Condições de hibridização	Referência
TGV-BZ-A- <i>Xho</i> I	DNA-A: <i>rep</i> , RC e <i>cp</i>	37°C/13 horas	obtida por F.M. Zerbini
TGV-BZ-A- <i>EcoR</i> I	DNA-A: <i>rep</i> , RC e <i>cp</i>	58°C/22 horas	obtida por F.M. Zerbini
RFUb49-total	DNA-A: genoma completo	68°C/ 22 horas 59°C/ 7h30 min.	este trabalho
Ub49 (A1+496)*	DNA-A: <i>rep</i>	68°C/22 horas	este trabalho
TGV-Ub1-B24- <i>Xho</i> I	DNA-B: <i>mp</i>	37°C/13 horas	este trabalho
pTG1.4B	DNA-B: <i>ns</i> e <i>mp</i>	58°C/22 horas	HAMILTON et al., 1984
Ub62 (<i>Nco</i> I- <i>Hind</i> III)	DNA-B: RC e região intergênica	68°C/22 horas	este trabalho

(*) oligonucleotídeos Ub-A1-v (Quadro 2) e PAR1c496 (ROJAS et al., 1993).

Células competentes de *E. coli* foram transformados com os plasmídeos recombinantes pelo método do choque térmico. As colônias foram plaqueadas em meio 2xYT (SAMBROOK et al., 1989) com ampicilina (100 mg/ml), IPTG e X-Gal. Colônias recombinantes foram identificadas pela sua coloração branca, transferidas para meio 2xYT líquido com ampicilina (10 mg/ml) e incubadas a 37°C durante 12 a 14 horas a 250 rpm. Os plasmídeos isolados dessas culturas (SAMBROOK et al., 1989) foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%) a fim de identificar aqueles que continham insertos de aproximadamente 2,6 kpb.

2.4.2. Caracterização dos clones obtidos

Os clones genômicos obtidos foram inicialmente caracterizados por meio de hibridização molecular, utilizando-se as sondas TGV-BZ-A-*EcoR* I,

Ub49 (A1+496), pTG1.4B e Ub62 (*Nco* I-*Hind* III) (Quadro 1), marcadas com digoxigenina. A marcação, hibridização e revelação foram realizadas com o kit “DIG DNA Labeling and Detection” (Boehringer Mannheim), conforme as recomendações do fabricante.

2.4.3. Seqüenciamento dos componentes genômicos completos

Os componentes A e B clonados foram seqüenciados completamente, por meio da subclonagem de fragmentos a partir dos clones dos genomas completos. A subclonagem foi realizada por meio da digestão dos clones com diferentes enzimas de restrição, seguida de separação dos fragmentos virais em gel de agarose (0,7%) e purificação dos fragmentos a partir do gel utilizando o kit “Sephaglass Bandprep” (Pharmacia Biotech). Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pKS+, previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado da mesma forma. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *E. coli*, conforme descrito no item 2.4.1.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer) e analisadas em seqüenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, conforme as recomendações dos fabricantes. Em alguns casos, oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados para completar o seqüenciamento do genoma completo (Quadro 2).

As seqüências obtidas a partir de subclones ou com os oligonucleotídeos específicos foram posicionadas ao longo do genoma viral por meio de comparação com outros geminivírus já caracterizados, utilizando-se o programa BLAST n (ALTSCHUL et al., 1990). As seqüências que apresentavam sobreposição foram montadas utilizando-se o programa GCG (DEVEREUX et al., 1984).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento dos genomas virais completos

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região de anelamento
Ub-A1-v*	5'-GGTAGTTATGGTAGCTC-3'	Posição 2.550 de pUb1-49-A
Ub-A2-v	5'-GCGTGAATCCATGTCCTG-3'	Posição 1.344 de pUb1-49-A
Ub-B1-c	5'-CCCATCAGAGGCGGGC-3'	Posição 1.544 de pUb1-81-B
Ub-B2-v	5'-CGAGGAATCAGGAGAAGA-3'	Posição 2.335 de pUb1-81-B
Ub-B3-v	5'-TGTATGGATGCATCGCG-3'	Posição 1.498 de pUb1-81-B
Ub-B4-c	5'-GCAGCTACCAATTGGTAG-3'	Posição 2.480 de pUb1-81-B
Ub-B5-c	5'-CTAACAGGGCGTTCTTGC-3'	Posição 1.108 de pUb1-81-B
Ub-B6-c	5'-GAACACGGTCAATCTTG-3'	Posição 746 de pUb1-81-B

(*) v, sentido viral; c, sentido complementar.

2.4.4. Descrição dos subclones obtidos

O clone pUb1-49 foi clivado com as enzimas de restrição *ClaI*, *KpnI* e *XhoI*, liberando-se fragmentos de 2.200, 1.400 e 1.100 nucleotídeos (nt), respectivamente. Os fragmentos complementares respectivos de 400, 1.200, e 1.500 nt, permaneceram ligados ao vetor (Figura 13). Cada um dos fragmentos liberados foi separado por eletroforese, removido do gel de agarose, e clivado com a enzima *EcoRI*. Os fragmentos flanqueados por sítios de *ClaI* e *EcoRI* de 2.200 nt, *KpnI* e *EcoRI* de 1.400 nt, e *XhoI* e *EcoRI* de 1.100 nt foram clonados em vetor pKS+ previamente preparado com as mesmas enzimas, resultando nos subclones pUb1-49-s16, pUb1-49-s04 e pUb1-49-s10, respectivamente. Os fragmentos que permaneceram ligados ao vetor foram removidos do gel de agarose e recircularizados, resultando nos subclones pUb1-49-s19, pUb1-49-s01,

e pUb1-49-s07 contendo um inserto de 400 nt flanqueado por sítios de *EcoRI* e *ClaI*, 1.200 nt flanqueado por sítios de *EcoRI* e *KpnI*, e 1.500 nt flanqueado por sítios de *EcoRI* e *XhoI*, respectivamente.

O clone pUb1-62 foi clivado com as enzimas de restrição *ApaI*, *HindIII*, e *KpnI*, liberando-se fragmentos de 700, 1.600 e 1.100 nt, respectivamente. Fragmentos complementares de 1.900, 1.000 e 1.500 nt, respectivamente, permaneceram ligados ao vetor (Figura 14). Cada um dos fragmentos liberados foi separado por eletroforese, removido do gel de agarose, e clivado com a enzima *BamHI*. Os fragmentos flanqueados por sítios de *ApaI* e *BamHI* de 700 nt, *HindIII* e *BamHI* de 1.600 nt, e *KpnI* e *BamHI* de 1.100 nt foram clonados em vetor pKS+ previamente preparado com as mesmas enzimas, resultando nos subclones pUb1-62-s28, pUb1-62-s24 e pUb1-62-s26, respectivamente. Os fragmentos que permaneceram ligados ao vetor foram removidos do gel de agarose e recircularizados, resultando nos subclones pUb1-62-s22, pUb1-62-s18, e pUb1-62-s20 contendo um inserto de 1.900 nt flanqueado por sítios de *BamHI* e *ApaI*, 1.000 nt flanqueado por sítios de *BamHI* e *HindIII*, e 1.500 nt flanqueado por sítios de *BamHI* e *KpnI*, respectivamente. Da clivagem com *SstI* fez-se a recircularização de um fragmento viral de 2.200 nt que permaneceu ligado ao vetor, eliminando-se um fragmento complementar de 400 nt, originando o subclone pUb1-62-s16 (Figura 14). Posteriormente, o subclone pUb1-62-s18 foi clivado com *SstI*. Da clivagem de pUb1-62-s18 com *Ss I* eliminou-se o fragmento liberado de 400 nt e fez-se a recircularização com o fragmento viral de 600 nt, construindo-se o subclone pUb1-62-s30. Este último subclone foi clivado com as enzimas *EcoRV/Ss I*, ou *NcoI/HindIII*. As extremidades não compatíveis foram preenchidas com nucleotídeos utilizando a enzima *Pfu Turbo DNA* polimerase, e o vetor foi religado com um fragmento de 360 e 570 nt para cada uma destas combinações, originando os subclones pUb1-62-s31 e pUb1-62-s32, respectivamente.

O clone pUb1-81 foi clivado com as enzimas de restrição *ApaI* e *NcoI*. Da clivagem com *ApaI* liberou-se um fragmento de 2.000 nt, e um fragmento

complementar de 600 nt permaneceu ligado ao vetor. O fragmento liberado foi separado por eletroforese, removido do gel de agarose, e clivado com a enzima *KpnI*. O fragmento de 2.000 nt flanqueado por sítios de *ApaI* e *KpnI* foi clonado em vetor pKS+ previamente preparado com as mesmas enzimas, resultando no subclone pUb1-81-s22. O fragmento que permaneceu ligado ao vetor foi removido do gel de agarose e recircularizado, resultando no subclone pUb1-81-s25 contendo um inserto de 600 nt flanqueado por sítios de *KpnI* e *ApaI*. Da clivagem com *NcoI* liberou-se um fragmento interno ao componente viral de 900 nt que foi eliminado, e o vetor contendo o fragmento complementar de 1.700 nt que permaneceu ligado foi recircularizado, resultando no subclone pUb1-81-s13 (Figura 15).

2.5. Análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas para seus possíveis genes foram comparadas com outros geminivírus cujas seqüências estão disponíveis no GenBank (Quadro 3). Essa análise comparativa de seqüências permitiu a construção de árvores filogenéticas, utilizando-se o programa “Clustal W 1.7”. As seqüências de nucleotídeos dos componentes A desses vírus foram alinhadas pelo método “Clustal” do programa “DNA Star”. Utilizando esse mesmo programa, realizou-se o alinhamento das seqüências de aminoácidos codificadas pelas potenciais ORFs.

2.6. Obtenção de clones correspondentes a repetições parciais do genoma viral

Para aumentar a eficiência de recombinação do vírus nos ensaios de infectividade do genoma clonado, seus DNA completos foram clonados em repetições parciais entre duas origens de replicação. O clone pUb1-49 foi

Quadro 3 - Sequências de geminivírus utilizadas para a análise filogenética

Gênero/Espécie	Referência	Nº de acesso no GenBank
<i>Mastrevirus</i>		
<i>Maize streak virus</i> (MSV)	HOWELL (1984)	X01089
<i>Tobacco yellow dwarf virus</i> (TYDV)	MORRIS et al. (1992)	M81103
<i>Curtovirus</i>		
<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	STANLEY et al. (1986)	X04144
<i>Topocuvirus</i>		
<i>Tomato pseudo-curly top virus</i> (TPCTV)	BRIDDON et al. (1996)	X84735
<i>Begomovirus</i>		
<i>Bean dwarf mosaic virus</i> (BDMV)	GILBERTSON et al. (1991)	M88179 ^a M88180 ^b
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV-Br)	GILBERTSON et al. (1991)	M88686 ^a M88687 ^b
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV-DR)	GILBERTSON et al. (1991) FARIA et al. (1994)	L01635 ^a L01636 ^b
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV-GA)	FARIA et al. (1994)	M91604 ^a M91605 ^b
<i>Pepper huasteco virus</i> (PHV)	TORRES-PACHECO et al. (1993)	X70418 ^a X70419 ^b
<i>Squash leaf curl virus</i> (SqLCV)	LAZAROWITZ e LAZDINS (1991)	M38183 ^a M38182 ^b
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	HAMILTON et al. (1984)	K02029 ^a K02030 ^b
<i>Tomato mottle virus</i> (ToMoV)	ABOUZID et al. (1992)	L14460 ^a L14461 ^b
<i>Sida golden mosaic virus</i> (SiGMV)	HÖFER et al. (1997a)	X99550 ^a X99551 ^b
<i>Chino del tomate virus</i> (CdTV)	BROWN e NELSON (1988)	AF226665 ^a AF226666 ^b
<i>Tomato leaf crumple virus</i> (TLCV)	JIANG et al (1998)	AF101476 ^a AF101478 ^b
<i>Potato yellow mosaic virus</i> (PYMV)	CONTTS et al (1991)	D00940 ^a D00941 ^b
<i>Cowpea golden mosaic virus</i> (CGMV)	-	AF188708 ^{ac}
<i>Leonurus mosaic virus</i> (LeMV)	-	U92532 ^{ac}
<i>Lima bean golden mosaic virus</i> (LBGMV)	-	U92531 ^{ac}
<i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MGMV)	-	AF098940 ^{ac}
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> (TYVSV)	-	U79998 ^{ac}

Quadro 3, Cont.

Gênero/Espécie	Referência	Nº de acesso no GenBank
<i>Begomovirus</i>		
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV-Sar)	KHEYR-POUR et al. (1991)	X61153
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV-Si)	CRESPI et al. (1995)	Z28390
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	STANLEY e GAY (1983)	J02057 ^a J02058 ^b

(^a) componente A.

(^b) componente B.

(^c) seqüência parcial.

(-) não publicado.

linearizado com a enzima de restrição *EcoRI*. O produto da ação enzimática foi separado por eletroforese em gel de agarose e o fragmento em torno de 2.600 nt foi purificado a partir do gel. Simultaneamente o subclone pUb1-49-s16, com inserto de aproximadamente 2.200 nt flanqueado por sítios de *Cla I* e *EcoRI*, foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* e desfosforilado com 1 U de fosfatase alcalina a 37°C por 30 minutos. O fragmento de 2.600 nt liberado de pUb1-49 foi ligado ao subclone pUb1-49-s16 previamente linearizado com *EcoRI* e desfosforilado, resultando no clone pUb1-G1, que contém 1,8 cópias do genoma viral de pUb1-49.

Para obtenção de um clone correspondente a uma repetição parcial de pUb1-81 foi utilizado o subclone pUb1-81-s24, que contém um inserto do genoma viral de aproximadamente 2.000 nt, flanqueado por sítios de *ApaI* e *KpnI*. O genoma viral completo foi liberado de pUb1-81 com *KpnI* e clonado no sítio de *KpnI* de pUb1-81-s24 previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado. O clone resultante contém 1,75 cópia do genoma viral e foi denominado pUb1-G4.

Para obtenção de um clone correspondente a uma repetição parcial de pUb1-62 foi utilizado o subclone pUb1-62-s18, que contém um inserto do

genoma viral de aproximadamente 1.000 nt flanqueado por sítios de *Bam*HI e *Hind*III. O genoma viral completo foi liberado de pUb1-62 com *Bam*HI e clonado no sítio de *Bam*HI de pUb1-62-s18 previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado. O clone resultante contém 1,4 cópia do genoma viral e foi denominado pUb1-G7.

2.7. Avaliação da infectividade dos clones

DNA plasmidial dos clones contendo repetições parciais do genoma viral foi isolado de acordo com procedimentos padrão (SAMBROOK et al., 1989), e a concentração de cada um foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%). O clone pUb1-G1, DNA-A, foi combinado com o clone pUb1-G4 ou com o clone pUb1-G7, ambos DNA-B. Aproximadamente 10 µg de cada clone (DNA A + DNA B) foram inoculados em plantas de *Nicotiana benthamiana* e *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’ pelo método de bombardeamento de partículas. Os plasmídeos recombinantes pTG1.3A e pTG1.4B, contendo os componentes A e B completos do TGMV, respectivamente, foram utilizados como controle positivo. Plantas não inoculadas e de mesma idade foram utilizadas como controle negativo. Cada tratamento consistiu de seis repetições. Cada repetição em *Nicotiana benthamiana* foi composta de um vaso com 2 a 5 plantas, e em *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Santa Clara’ foi composta de um vaso com 2 plantas. A mistura de DNA plasmidial recombinante foi precipitada em micropartículas de tungstênio na presença de CaCl₂ 1 M, espermidina 13 mM e etanol 70% (v/v), que foram depositadas em seis membranas carreadoras. Em seguida as membranas recobertas com DNA foram colocadas no acelerador de partículas, e aceleradas a 1000 psi contra as plantas a serem testadas. Um dia após o bombardeamento, as plantas foram transplantadas para vasos, transferidas para casa de vegetação e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 45 dias após a inoculação. Para diagnose da infecção viral, amostras de folhas das plantas de *Nicotiana benthamiana* com sintomas e de todas as repetições da

cv. ‘Santa Clara’ (com ou sem sintomas) foram coletadas no ápice da planta e/ou no local da inoculação, aos 45 e 32 dias após a inoculação, respectivamente, e analisadas via PCR. As amostras com infecção sistêmica originada de clones obtidos a partir do complexo viral TGV-Ub1 foram também analisadas por hibridização molecular com as sondas Ub49 (A1+496) e RFUb49-total (Quadro 1) preparadas e analisadas com o kit “DIG DNA Labeling and Detection” (Boehring Mannheim) utilizando tampão padrão conforme recomendações do fabricante, a fim de confirmar que a infecção era causada pelo vírus clonado.

2.8. Caracterização biológica do TRMV

2.8.1. Transmissão via extrato vegetal tamponado

Folhas sintomáticas de *Nicotiana benthamiana* bombardeada com a combinação pUb1-G1 + pUb1-G4 e positivas para a amplificação de fragmento de DNA de geminivírus via PCR foram utilizadas como fonte de inóculo para testar a transmissibilidade do TRMV via EVT (item 2.3). O primeiro teste consistiu na inoculação do TRMV via extrato de folhas de *Nicotiana benthamiana* infectada com este vírus em 8 plantas de *Nicotiana benthamiana*. Como controle negativo foram utilizadas 4 plantas sadias desta indicadora. O segundo teste constituiu na inoculação do TRMV e do complexo viral TGV-Ub1 em dez plantas de *Nicotiana benthamiana* para cada tratamento, e de 10 plantas sadias como controle negativo. As plantas foram mantidas em telado e observadas para o surgimento de sintomas durante um mínimo de 30 dias após a inoculação. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 2.3, com folhas de *N. benthamiana* infectada com o TRMV e com o complexo TGV-Ub1. Para confirmar a transmissão do TRMV e do complexo viral TGV-Ub1, extraiu-se DNA das plantas aos 27 e 20 dias após a inoculação para o primeiro e segundo teste de transmissão, respectivamente, e verificou-se a amplificação de

fragmentos de DNA via PCR com os oligonucleotídeos universais PAR1c496 e PAL1v1978.

2.8.2. Gama de hospedeiros

Objetivando determinar a gama de hospedeiros do TRMV, realizou-se a hibridização do DNA amplificado a partir das plantas indicadoras positivas para a infecção com o complexo viral TGV-Ub1 via extrato vegetal tamponado (item 2.3) e por enxertia (item 2.1), utilizando-se a sonda RFUb49-total (Quadro 1), marcada com digoxigenina, preparada e analisada com o kit “DIG DNA Labeling and Detection” (Boehringer Mannheim), conforme as recomendações do fabricante.

2.8.3. Inoculação em *Solanum tuberosum* e *Datura stramonium* por enxertia

Cinco plantas de *Solanum tuberosum* cv. ‘ Bintje ’ e seis de *Datura stramonium* foram enxertadas com ápices de tomateiro ‘ Santa Clara ’ bombardeado com a combinação pUb1-G1 + pUb1-G4. Após a enxertia, as plantas foram mantidas em telado e observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas durante 35 dias. Extraíu-se DNA das plantas testadas e de uma testemunha assintomática aos 27 dias após a enxertia e submeteu-se à diagnose via PCR, conforme descrito no item 2.1.

2.8.4. Detecção de componentes genômicos do TRMV em hospedeiros alternativos

Objetivando verificar a ocorrência do TRMV em outros hospedeiros e em plantas daninhas em condições de campo, coletaram-se amostras de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e de joá-de-capote (*Nicandra physaloides*)

com sintomas semelhantes aos de infecção por geminivírus. As plantas foram coletadas próximas à cultura de tomateiro na propriedade D (Capítulo 2, Figura 44 e Quadro 21), em Araguari, MG. O DNA foi extraído das amostras coletadas pelo método de DELLAPORTA et al. (1983). A detecção de begomovírus foi realizada via PCR, conforme descrito no item 2.1. Os fragmentos amplificados via PCR foram clonados e seqüenciados, a fim de identificar o vírus em questão.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação biológica dos geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1

Dois tomateiros ‘Miller Early’ inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 por enxertia desenvolveram sintomas com diferentes graus de severidade (Figura 2). Os isolados virais presentes nessas plantas foram denominados TGV-Ub1-Enx-11 e TGV-Ub1-Enx-13. Ambos causaram amarelecimento de nervuras, mosaico amarelo entre as nervuras secundárias, deformação foliar e epinastia, em princípio semelhantes aos sintomas causados pelo complexo viral TGV-Ub1. Entretanto, os sintomas causados por TGV-Ub1-Enx-11 foram mais severos do que os causados por TGV-Ub1-Enx-13. Além disso, os sintomas causados por cada um separadamente foram menos severos do que os observados quando a infecção era causada pelo TGV-Ub1.

Em PCR com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus, observou-se a amplificação de um único fragmento com aproximadamente 1.200 nt para o componente A de cada isolado. Entretanto, o fragmento correspondente ao isolado TGV-Ub1-Enx-11 era um pouco maior do que o do isolado TGV-Ub1-Enx-13 (Figura 3). Este comportamento também foi

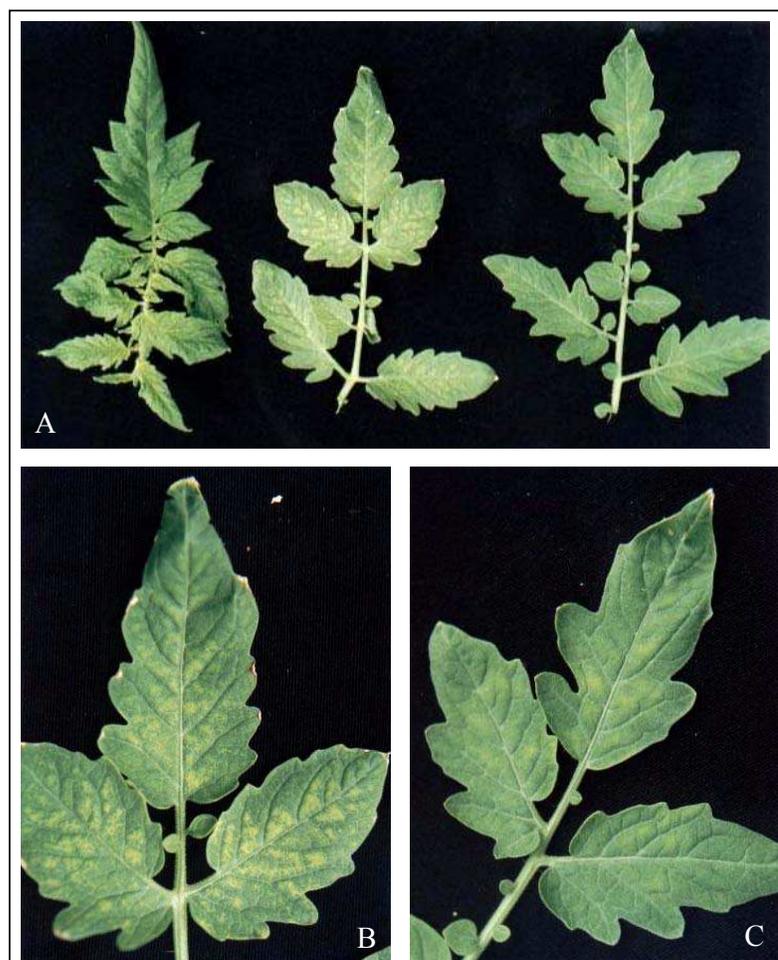


Figura 2 - Sintomas, em tomateiro 'Miller Early', da infecção por geminivírus purificados biologicamente por enxertia a partir de tomateiro 'Santa Clara' infectado com o complexo viral TGV-Ub1: (A) Planta sadia à esquerda, isolado TGV-Ub1-Enx-11 ao centro e isolado TGV-Ub1-Enx-13 à direita, (B) detalhes dos sintomas causados pelo isolado TGV-Ub1-Enx-11, e (C) pelo isolado TGV-Ub1-Enx-13.

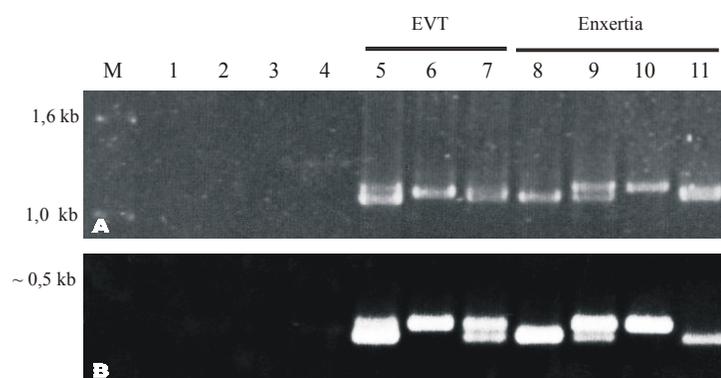


Figura 3 - Amplificação de fragmentos do genoma de geminivírus, via PCR, com oligonucleotídeos universais para begomovírus, a partir de plantas inoculadas por enxertia ou extrato vegetal tamponado (EVT) com o complexo viral TGV-Ub1 ou com geminivírus purificados biologicamente a partir de TGV-Ub1. **A**, fragmentos do DNA-A, **B**, fragmentos do DNA-B; **5 a 7**, gama de hospedeiros preliminar inoculada por EVT, **8 a 11**, enxertia de ápice de tomateiro ‘Santa Clara’ infectado com TGV-Ub1 em ‘Miller Early’. (1) *Nicotiana benthamiana* sadia, (2) tomateiro ‘Ângela Hiper’ sadio, (3) tomateiro ‘Miller Early’ sadio, (4) *Bemisia tabaci* avirulífera, (5) *Nicotiana benthamiana* inoculada com TGV-Ub1, (6) ‘Ângela Hiper’ inoculado com TGV-Ub1, (7) ‘Miller Early’ inoculado com TGV-Ub1, (8) ‘Miller Early’ inoculado com TGV-Ub1-Enx-11, (9) ‘Miller Early’ inoculado com TGV-Ub1-Enx-12, (10) ‘Miller Early’ inoculado com TGV-Ub1-Enx-13, (11) ‘Miller Early’ inoculado com TGV-Ub1-Enx-14. Eletroforese em gel de agarose (1,2%).

observado para a amplificação do fragmento correspondente ao componente B de cada um desses isolados (Figura 3). Para o complexo viral TGV-Ub1, amplificaram-se dois fragmentos de DNA para cada componente do genoma viral. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados para os componentes A e B dos isolados TGV-Ub1-Enx-11 e -Enx-13 corresponderam aos dos fragmentos amplificados a partir do complexo original (TGV-Ub1).

As plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 também apresentaram sintomas com dois graus distintos de severidade. Uma baixa porcentagem de plantas apresentou mosaico amarelo, distorção foliar e redução do crescimento menos intensos do que a maioria das plantas, que apresentaram sintomas severos de mosaico dourado, epinastia, deformação foliar e nanismo.

A análise via PCR da infecção viral por begomovírus nestes dois grupos de plantas revelou que as plantas com sintomas de maior severidade apresentavam a amplificação de dois fragmentos de DNA com aproximadamente 1.200 nt para o componente A (Figura 3), mas com pequena diferença de tamanho entre eles. O tamanho destes fragmentos era semelhante ao daqueles observados nas plantas de tomateiro ‘Miller Early’ inoculadas por enxertia (item 3.1). Com as plantas de *N. benthamiana* com sintomas menos severos foi amplificado apenas um fragmento de DNA de menor tamanho, para ambos os componentes do genoma viral.

O isolado viral presente em *Nicotiana benthamiana* com amplificação do menor fragmento de DNA foi transferido para tomateiro ‘Santa Clara’ por enxertia e denominado TGV-Ub1-peq. O isolado TGV-Ub1-peq causou em tomateiro ‘Santa Clara’ sintomas de amarelecimento de nervuras, mosaico amarelo e deformação foliar de menor severidade do que os sintomas induzidos pelo complexo viral TGV-Ub1.

3.2. Caracterização biológica do complexo viral TGV-Ub1

3.2.1. Gama de hospedeiros

3.2.1.1. Inoculação via extrato vegetal tamponado (EVT)

Os resultados dos testes de gama de hospedeiros via inoculação por EVT estão apresentados nos Quadros 4 e 5. O Quadro 6 lista os sintomas observados nas plantas infectadas pelo TGV-Ub1 por meio deste método de inoculação. A infecção foi confirmada via PCR com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus.

Apenas espécies pertencentes à família *Solanaceae* foram infectadas pelo TGV-Ub1 após inoculação via EVT. Os sintomas observados em cada espécie foram pouco variáveis em cada experimento e cultivar avaliada. As variações observadas ocorreram principalmente entre inoculações sucessivas e cultivares. As cultivares de tomateiro ‘Santa Clara’ e ‘Ângela Hipper’ sempre apresentaram sintomas mais severos e típicos de mosaico dourado do que as cultivares ‘Miller Early’ e ‘Rutgers’. Os sintomas de infecção por TGV-Ub1 em *Nicotiana glutinosa* foram tornando-se mais freqüentes e mais severos ao longo dos três experimentos de gama de hospedeiros. O oposto foi observado com *Nicotiana clevelandii*. Nesta espécie os sintomas tornaram-se menos severos e menos freqüentes. *Nicotiana benthamiana* foi a espécie testada que apresentou um comportamento mais variável em um mesmo experimento, podendo-se observar plantas com alta e baixa severidade de sintomas, embora predominando plantas com maior severidade e sintomas mais semelhantes a mosaico dourado. Em *Nicandra physaloides*, os sintomas de infecção por TGV-Ub1, apesar de terem ocorrido em baixa freqüência, foram muito severos (Figura 4). Em testes de PCR com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus, todas as plantas com sintomas de infecção viral foram positivas para a presença de fragmentos com aproximadamente 1.200 nt (Figura 5). *Nicotiana rustica* e as cultivares de *Nicotiana tabacum* testadas por este método de inoculação não

Quadro 4 - Resultados do teste preliminar de gama de hospedeiros do complexo viral TGV-Ub1, aos 31 dias após a primeira inoculação via extrato vegetal tamponado

Espécies testadas	Sintomas ^a		Infecção por TGV-Ub1 ^b
	Controle (-)	TGV-Ub1	
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Angela Hipper’	0/2	5/10	+
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Miller Early’	0/2	4/10	+
<i>Nicandra physaloides</i>	0/2	1/10	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/2	10/10	+
<i>N. clevelandii</i>	0/2	5/10	+
<i>N. glutinosa</i>	0/2	1/10	+
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	0/2	0/10	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Carioca 80’	0/2	0/10	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Preto 153’	0/2	0/10	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Santana’	0/2	0/12	-
<i>Physalis floridana</i>	0/2	0/9	-
<i>Solanum nigrum</i>	0/2	0/10	-

(a) número de plantas com sintomas/número de plantas testadas.

(b) +, positivo para amplificação de fragmento do genoma viral via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus; -, negativo para amplificação via PCR.

Quadro 5 - Resultados do teste de gama de hospedeiros do complexo viral TGV-Ub1, 35 dias após a primeira inoculação via extrato vegetal tamponado.

Espécies testadas	Sintomas ^a									PCR ^b								
	Controle (-)				TGV-Ub1					Controle (-)				TGV-Ub1				
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/2	*	0/2	0/4	0/7	*	0/10	0/17	0	*	*	0/2	0/2	*	*	0/6	0/6	0
<i>Cucurbita pepo</i> ‘Caserta’	0/2	*	0/2	0/4	0/8	*	0/6	0/14	0	*	*	0/2	0/2	*	*	0/6	0/6	0
<i>Gossypium hirsutum</i> ‘DeltaPine Acala 90’	0/2	*	0/2	0/4	0/8	*	0/8	0/16	0	*	*	0/2	0/2	*	*	0/8	0/8	0
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Rutgers’	0/2	0/1	0/2	0/5	1/8	0/6	0/8	1/22	4,5	0/1	*	0/2	0/3	1/1	*	0/8	1/9	11,1
<i>L. esculentum</i> ‘Santa Clara’	0/2	*	0/2	0/4	0/8	*	0/8	0/16	0	0/2	*	0/2	0/4	*	*	0/8	0/8	0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	8/8	11/11	10/10	29/29	100,0	0/2	*	0/2	0/4	7/8	11/11	10/10	29/29	100,0
<i>N. clevelandii</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	4/8	0/8	1/8	5/24	20,8	0/1	0/2	0/2	0/5	4/4	1/8	1/8	6/20	30,0
<i>N. glutinosa</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	6/8	8/8	14/24	58,3	0/1	*	0/2	0/3	4/4	6/8	8/8	18/20	90,0
<i>N. rustica</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	0/6	0/6	0/20	0	*	0/2	0/2	0/4	*	6/6	6/6	12/12	100,0
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	0/6	0/6	0/20	0	*	0/2	0/2	0/4	*	0/6	1/6	1/12	8,3
<i>N. tabacum</i> ‘Sansum’	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	0/6	0/6	0/20	0	*	0/2	0/2	0/4	*	1/6	1/6	2/12	16,7
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	0/6	0/6	0/20	0	*	0/2	0/2	0/4	*	1/6	0/6	1/12	8,3
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’	0/2	0/2	0/2	0/6	0/8	0/8	0/6	0/22	0	0/1	0/2	0/2	0/5	0/2	0/8	1/6	1/16	6,3

Quadro 5, Cont.

Espécies testadas	Sintomas ^a										PCR ^b									
	Controle (-)					TGV-Ub1					Controle (-)					TGV-Ub1				
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Total	%
<i>N. tabacum</i> 'White Burley'	0/2	0/2	0/2	0/6	0	0/8	0/9	0/5	0/22	0	0/1	0/2	0/2	0/5	0	0/2	1/9	2/5	3/16	18,8
<i>N. tabacum</i> 'Xanthi'	0/2	0/2	0/2	0/6	0	0/8	0/6	0/6	0/20	0	0/1	0/2	0/2	0/5	0	0/2	1/6	2/6	3/18	16,7
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Emgopa Ouro 201'	0/2	*	0/3	0/5	0	0/8	*	0/12	0/20	0	0/1	*	0/3	0/4	0	0/1	*	0/12	0/13	0
<i>Physalis floridana</i>	0/2	*	0/2	0/4	0	0/8	*	0/4	0/12	0	*	*	0/2	0/2	0	*	*	0/4	0/4	0
<i>Sida rhombifolia</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	0	0/11	0/7	0/4	0/22	0	*	0/2	0/2	0/4	0	*	0/7	0/4	0/11	0
<i>Solanum nigrum</i>	0/2	0/2	0/2	0/6	0	0/8	0/6	0/6	0/20	0	*	0/2	0/2	0/4	0	*	0/6	0/5	0/11	0

(a) número de plantas com sintomas/número de plantas inoculadas.

(b) número de plantas positivas para amplificação de fragmento do genoma viral via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus/número de plantas inoculadas.

(*) não testado.

Quadro 6 - Sintomas observados em plantas inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 via extrato vegetal tamponado. A infecção foi avaliada visualmente até 31-35 dias após a inoculação, e confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus (ROJAS et al., 1993).

Espécies testadas	Sintomas
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Angela Hipper’	am-n, df, ep, md, rc
<i>L. esculentum</i> ‘Miller Early’	am-n, df, ep, mos-a, rc
<i>L. esculentum</i> ‘Santa Clara’	am-n, df, ep, md, rc
<i>L. esculentum</i> ‘Rutgers’	am-n, df, ep, mos-a, rc
<i>Nicandra physaloides</i>	df, ep, md
<i>Nicotiana benthamiana</i>	am-n, df, ep, md, mos-a
<i>N. clevelandii</i>	df, mos-a
<i>N. glutinosa</i>	am-n, df, ep, mfa
<i>N. rustica</i>	-
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	-
<i>N. tabacum</i> ‘Sansum’	-
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	-
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’	-
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	-
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	-

Sintomas: am-n = amarelecimento de nervuras; df = distorção foliar; ep = epinastia; mfa = mancha foliar amarela; md = mosaico dourado; mos = mosaico; mos-a = mosaico amarelo; rc = redução de crescimento; (-) assintomática no período e condições avaliadas.

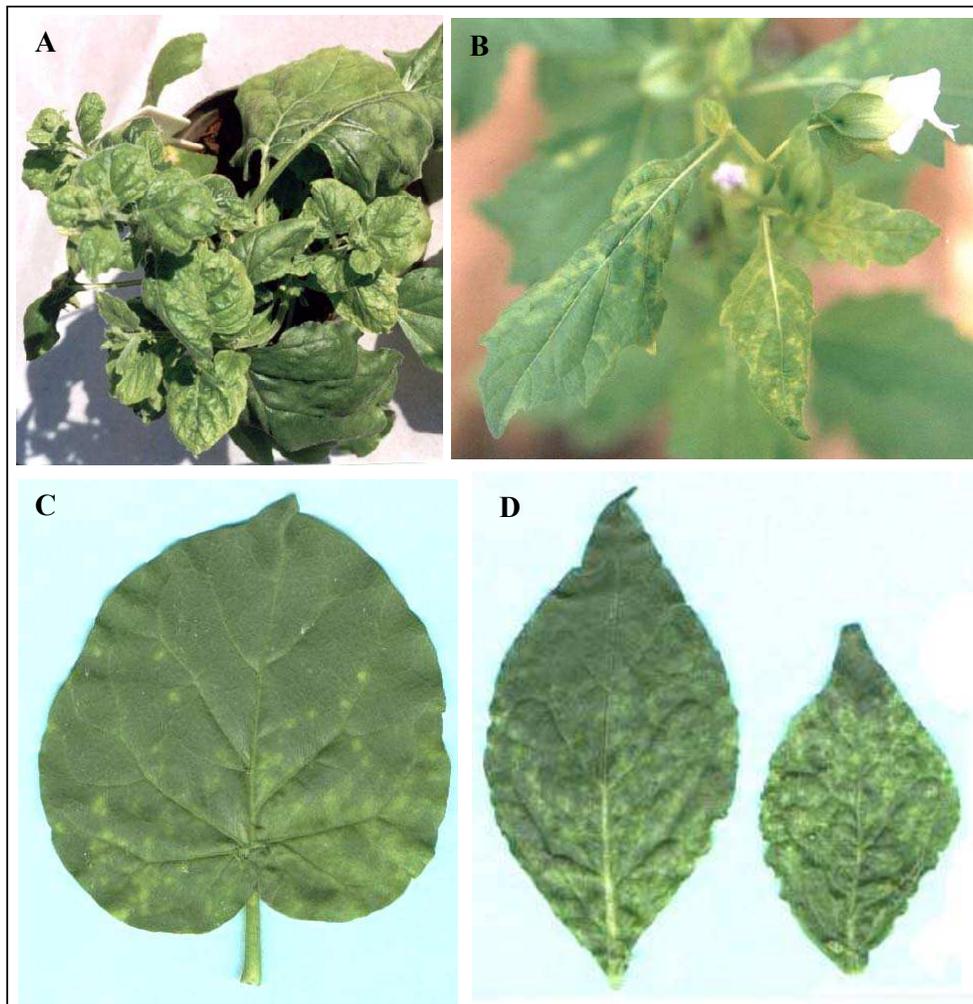


Figura 4 - Sintomas da infecção pelo complexo viral TGV-Ub1 após inoculação via extrato vegetal tamponado em (a) *Nicotiana benthamiana*, (b) *Nicotiana physaloides*, (c) *Nicotiana glutinosa*, e (d) *Nicotiana clevelandii*.

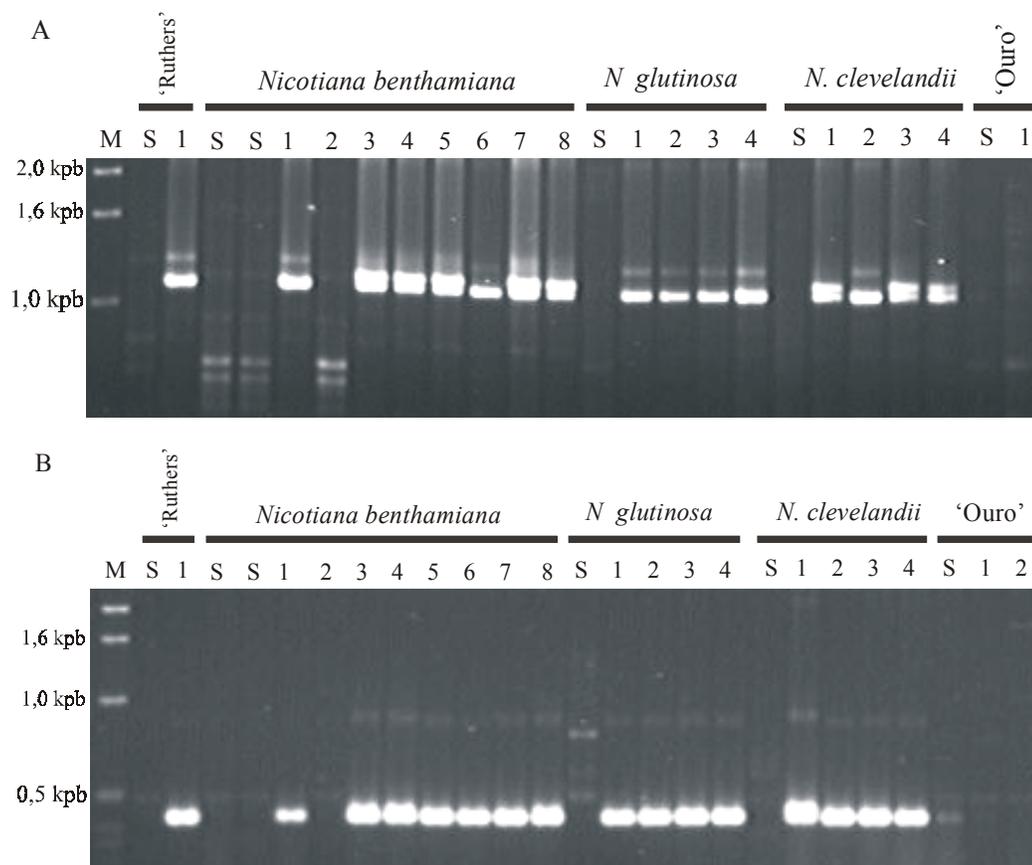


Figura 5 - Diagnose da infecção pelo complexo viral TGV-Ub1 nas espécies inoculadas via extrato vegetal tamponado (EVT). PCR utilizando os oligonucleotídeos universais (A) PAR1v496 e PAL1c1978 e (B) PCRc1 e PBL1v2040 (ROJAS et al., 1993) e DNA extraído de plantas inoculadas via EVT: 'Rutgers', tomateiro cv. Rutgers, 'Ouro', feijoeiro cv. Emgopa Ouro 201, S, planta sadia. Os números referem-se às repetições de plantas inoculadas. (M) marcador ("1 kb DNA ladder"); (A) gel de agarose a 0,7% e (B) gel de agarose a 1,4%.

apresentaram sintomas de infecção viral, mas o PCR detectou uma baixa frequência de infecções por TGV-Ub1 nas cultivares de *Nicotiana tabacum* e uma alta frequência em plantas de *Nicotiana rustica*. Os índices de infecção por TGV-Ub1 nesta última espécie foram iguais aos observados em *Nicotiana benthamiana*.

Por este método de inoculação, as espécies *Physalis floridana*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium quinoa*, *Sida rhombifolia*, *Phaseolus vulgaris* ‘Emgopa Ouro 201’, *Cucurbita pepo* ‘Caserta’ e *Gossypium hirsutum* ‘DeltaPine Acala 90’ não desenvolveram nenhum tipo de sintomas de infecção viral e não apresentaram amplificação de DNA para o componente A de begomovírus via PCR.

3.2.1.2. Inoculação por enxertia

Os resultados dos testes de gama de hospedeiros via inoculação por enxertia estão apresentados no Quadro 7. A Figura 6 ilustra os sintomas observados em tomateiro ‘Santa Clara’, *Datura stramonium*, *Solanum tuberosum* e *Nicotina tabacum* ‘TNN’. O Quadro 8 apresenta os sintomas observados nas plantas infectadas utilizando-se este método de inoculação. A infecção foi confirmada via PCR com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus.

De forma idêntica à inoculação via EVT, todas as espécies infectadas pelo complexo viral TGV-Ub1 após inoculação por enxertia pertencem a *Solanaceae*. Os sintomas observados em cada espécie foram pouco variáveis em cada experimento e cultivar avaliada. As cultivares de tomateiro foram utilizadas como controles para a transmissão, mas destaca-se o fato de que os sintomas observados em ‘Rutgers’ infectado por TGV-Ub1 por este método de inoculação foram mais severos do que os sintomas apresentados quando a infecção ocorreu via EVT. Todas as cultivares de *Nicotiana tabacum* inoculadas por enxertia

Quadro 7 - Resultados do teste de gama de hospedeiros do complexo viral TGV-Ub1, aos 30 a 45 dias após inoculação por enxertia

Planta teste	Sintomas ^a			PCR ^b		
	Preliminar	Rep. 1	Rep. 2	Preliminar	Rep. 1	Rep. 2
<i>Capsicum frutescens</i> ‘Malagueta’	0/3	*	*	0/3	*	*
<i>C. annuum</i> ‘Casca Dura Ikeda’	0/5	*	0/2	0/5	*	0/2
<i>Datura stramonium</i>	11/11	*	*	1/1	*	*
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Santa Clara’	13/13	*	2/2	13/13	*	2/2
<i>L. esculentum</i> ‘Rutgers’	8/8	1/1	2/2	8/8	1/1	2/2
<i>Nicotiana rustica</i>	0/3	0/2	0/2	1/3	1/2	0/2
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	3/6	*	½	4/5	*	1/2
<i>N. tabacum</i> ‘Sansum’	¾	1/2	½	4/4	1/2	0/2
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	3/6	1/2	½	6/6	1/2	1/2
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’	*	2/2	2/2	*	2/2	2/2
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	4/4	2/2	½	4/4	2/2	2/2
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	3/3	1/2	2/2	3/3	1/2	2/2
<i>Physalis floridana</i>	0/2	*	0/3	0/2	*	0/3
<i>Solanum gilo</i> ‘Verde Claro Comprido’	0/2	*	*	0/2	*	*
<i>S. melongena</i> ‘Embu’	0/3	*	0/2	0/3	*	0/2
<i>S. nigrum</i>	*	0/3	0/2	*	0/3	0/2
<i>S. tuberosum</i>	3/3	*	*	3/3	*	*

(a) número de plantas com sintomas/ número de plantas inoculadas.

(b) número de plantas positivas para amplificação de fragmento do genoma viral via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus/número de plantas inoculadas.

(*) não testada.

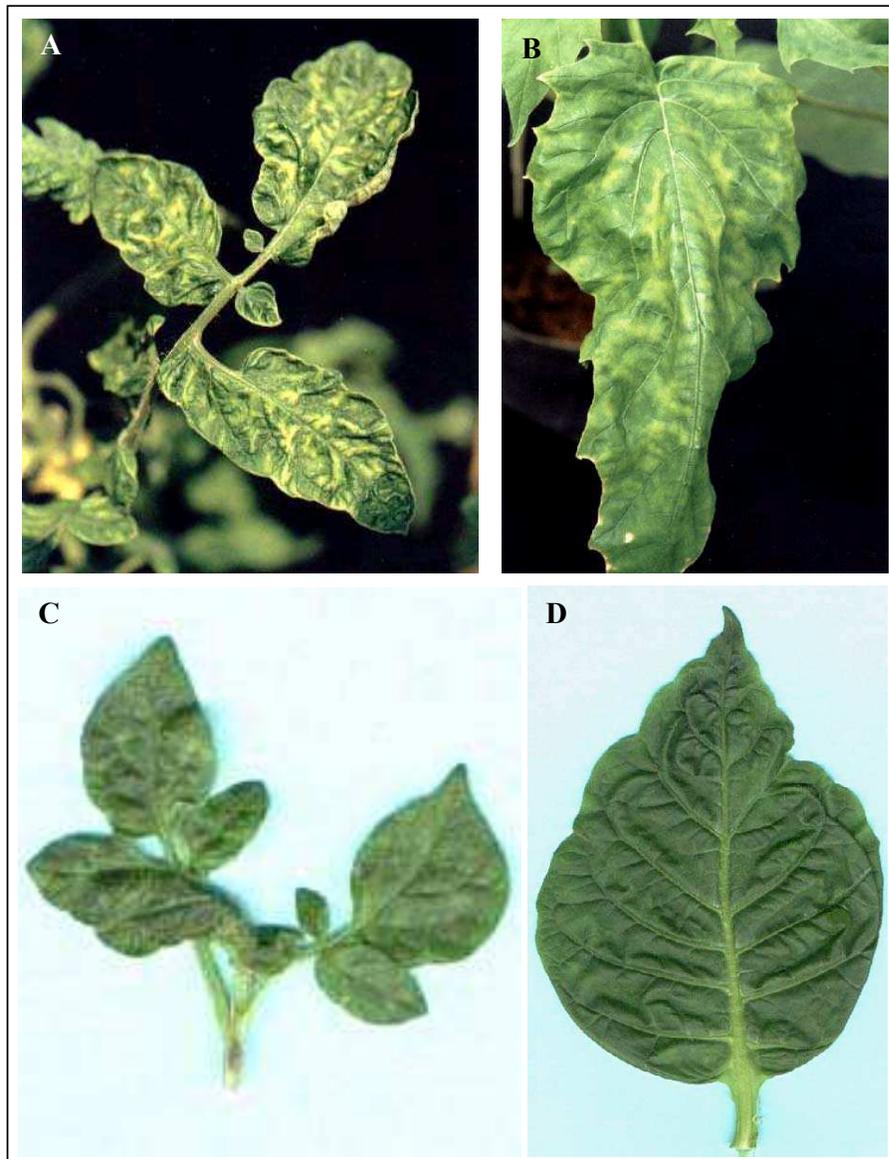


Figura 6 - Sintomas de infecção pelo complexo viral TGV-Ub1 inoculado por enxertia, em (a) *Lycopersicon esculentum* 'Santa Clara', (b) *Datura stramonium*, (c) *Solanum tuberosum*, e (d) *Nicotina tabacum* 'TNN'.

Quadro 8 - Sintomas observados nas plantas inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 por enxertia. A infecção foi avaliada visualmente até 35-45 dias após a enxertia, e confirmada via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus (ROJAS et al., 1993)

Espécies testadas	Sintomas
<i>Datura stramonium</i>	df, ep, md, rc
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Santa Clara’	am-n, df, ep, md, rc
<i>L. esculentum</i> ‘Rutgers’	am-n, df, ep, md, rc
<i>Nicotiana rustica</i>	df, mos, rc
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	df, mos-a, rc
<i>N. tabacum</i> ‘Sansum’	df, mos
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	df, mos-a, rc
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’	df, mos
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	df, mos-a, rc
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	df, mos
<i>Solanum tuberosum</i>	df, mfa, rc

Sintomas: am-n = amarelecimento de nervuras; df = distorção foliar; ep = epinastia; mfa = mancha foliar amarela; md = mosaico dourado; mos = mosaico; mos-a = mosaico amarelo; rc = redução de crescimento.

desenvolveram sintomas de infecção viral, embora os sintomas tenham sido em geral pouco severos. Nesta espécie, os sintomas foram mais visíveis nas cultivares ‘Havana 425’, ‘TNN’ (Figura 6) e ‘White Burley’, onde predominaram mosaico amarelo, deformação foliar e redução do crescimento. Nas cultivares ‘Xanthi’ e ‘Turkish’, os sintomas predominantes foram mosaico e deformação foliar. Na batateira (*Solanum tuberosum*), a infecção por TGV-Ub1 causou sintomas severos de deformação foliar, manchas foliares amarelas e redução de crescimento (Figura 6). Em testes de PCR com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus, todas as plantas com sintomas de infecção viral foram positivas para a presença de fragmentos com aproximadamente

1.200 nt. Entre as espécies que não desenvolveram sintomas, apenas uma planta de *Nicotina rustica* foi positiva para a amplificação de DNA de begomovírus.

As espécies cultivadas *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’, *Capsicum frutescens* ‘Malagueta’, *Solanum gilo* ‘Verde Claro Comprido’ e *Solanum melongena* ‘Embu’ não desenvolveram sintomas de infecção por TGV-Ub1 quando enxertadas com tomateiro infectado, e não se detectou infecção assintomática por meio dos testes moleculares utilizados neste trabalho. O mesmo foi observado para as espécies de plantas daninhas *Physalis floridana*, *Solanum nigrum* e *Sida rhombifolia*.

3.3. Caracterização molecular do complexo viral TGV-Ub1

3.3.1. Clonagem de forma replicativa e seqüenciamento parcial dos clones obtidos

A seleção de clones com inserto de tamanho aproximado ao da forma replicativa viral (2.600 nt) resultou em 87 clones candidatos para os componentes A e B presentes no complexo viral TGV-Ub1. Foram obtidos clones com inserto de DNA de tamanho aproximado ao das formas replicativas de geminivírus para todos os sítios de clonagem utilizados: 34, 6, 16, 6, e 24 clones utilizando-se os sítios de *Bam*H I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sst* I, e *Xho* I, respectivamente. O Quadro 9 identifica os clones obtidos. A Figura 7 apresenta o padrão eletroforético da clivagem do plasmídeo pUb1-49 com a enzima *Eco*R I, indicando que ele continha um inserto de aproximadamente 2.600 nt.

Utilizando oligonucleotídeos posicionados próximos ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pKS⁺ e direcionado para o DNA inserido no vetor, foi determinada a seqüência de nucleotídeos de pelo menos uma das extremidades do inserto de DNA dos plasmídeos recombinantes pUb1-04, pUb1-21, pUb1-25, pUb1-38, pUb1-49, pUb1-50, pUb1-55, pUb1-59, pUb1-62, pUb1-72, e pUb1-81. A comparação das seqüências obtidas com as seqüências de

Quadro 9 - Clones com inserto de DNA de tamanho aproximado ao das formas replicativas de geminivírus presentes no complexo viral TGV-Ub1

Sítio de clonagem	Código dos clones
<i>BamH</i> I	pUb1-25, pUb1-26, pUb1-27, pUb1-28, pUb1-29, pUb1-30, pUb1-31, pUb1-32, pUb1-33, pUb1-34, pUb1-35, pUb1-36, pUb1-37, pUb1-38, pUb1-39, pUb1-40, pUb1-41, pUb1-42, pUb1-43, pUb1-44, pUb1-45, pUb1-46, pUb1-47, pUb1-48, pUb1-60, pUb1-61, pUb1-62, pUb1-63, pUb1-64, pUb1-65, pUb1-66, pUb1-67, pUb1-68, pUb1-69
<i>EcoR</i> I	pUb1-49, pUb1-50, pUb1-51, pUb1-52, pUb1-53, pUb1-54, pUb1-70
<i>Kpn</i> I	pUb1-58, pUb1-59, pUb1-74, pUb1-75, pUb1-76, pUb1-77, pUb1-78, pUb1-79, pUb1-80, pUb1-81, pUb1-82, pUb1-83, pUb1-84, pUb1-85, pUb1-86, pUb1-87
<i>Sst</i> I	pUb1-55, pUb1-56, pUb1-57, pUb1-71, pUb1-72, pUb1-73
<i>Xho</i> I	pUb1-01, pUb1-02, pUb1-03, pUb1-04, pUb1-05, pUb1-06, pUb1-07, pUb1-08, pUb1-09, pUb1-11, pUb1-12, pUb1-13, pUb1-14, pUb1-15, pUb1-16, pUb1-17, pUb1-18, pUb1-19, pUb1-20, pUb1-21, pUb1-22, pUb1-23, pUb1-24

nucleotídeos de geminivírus depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) indicou que todos os clones apresentavam homologia significativa com o genoma de geminivírus, exceto os plasmídeos recombinantes pUb1-38 e pUb1-50, que apresentavam homologia significativa com seqüências de nucleotídeos de DNA mitocondrial (dados não apresentados). Dentre os plasmídeos analisados, os clones pUb1-04, pUb1-21, pUb1-49, pUb1-55, e pUb1-72 apresentaram maior homologia com o componente A de begomovírus, e os clones pUb1-25, pUb1-59, pUb1-62, e pUb1-81 foram mais

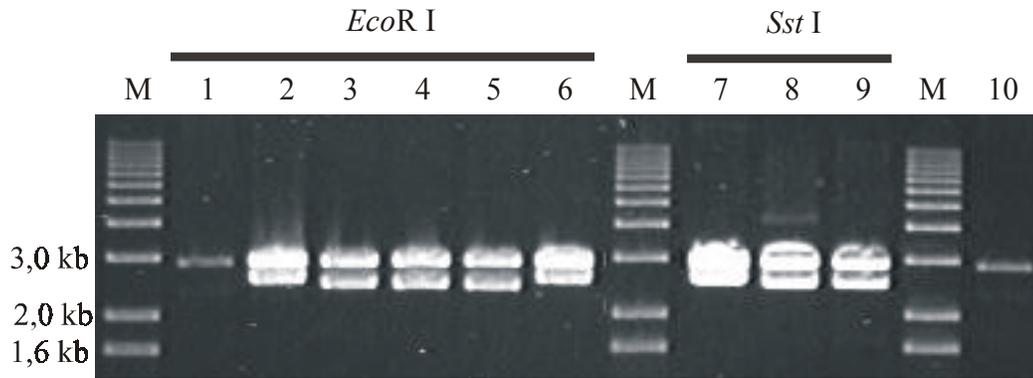


Figura 7 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) dos plasmídeos recombinantes clivados com *EcoR*I e *Sst*I: (1) e (10) pKS+ linearizado; (2) pUb1-49, (3) pUb1-50, (4) pUb1-51, (5) pUb1-52, (6) pUb1-53, (7) pUb1-55, (8) pUb1-56, e (9) pUb1-57, (M) marcador (“1 kb DNA ladder”).

homólogos ao componente B. Assim, os clones pUb1-49 e pUb1-81 foram selecionados ao acaso para subclonagem e prosseguimento dos trabalhos de obtenção da seqüência de nucleotídeos completa do genoma viral. A comparação da seqüência parcial de pUb1-62 com a seqüência de pUb1-81 revelou tratar-se de dois componentes B distintos. Assim, o clone pUb1-62 foi também selecionado para seqüenciamento e a obtenção da seqüência de nucleotídeos completa deste plasmídeo recombinante.

3.3.2. Seqüenciamento dos componentes genômicos completos

Os componentes virais clonados nos plasmídeos recombinantes pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 foram subclonados em fragmentos menores, a fim de facilitar o seqüenciamento do genoma viral (Figuras 8, 9 e 10). Uma vez que as regiões internas dos subclones não foram seqüenciadas totalmente ao se utilizarem os oligonucleotídeos M13F e M13R, o seqüenciamento foi

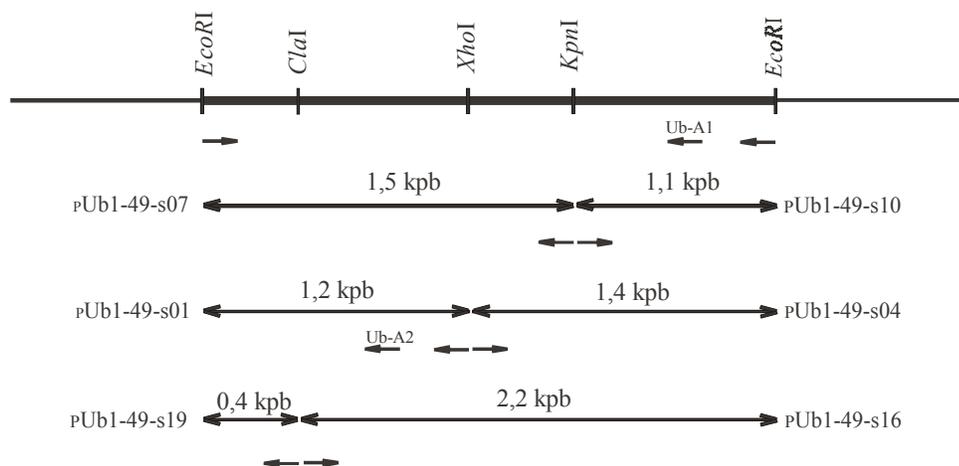


Figura 8 - Estratégia de seqüenciamento do inserto viral em pUb1-49. As setas bidirecionais indicam os subclones, com seus nomes na lateral e os respectivos tamanhos acima. As setas unidirecionais indicam a direção do seqüenciamento, e as setas com seus respectivos nomes acima posicionam os oligonucleotídeos sintetizados para completar o seqüenciamento.

completado utilizando-se oligonucleotídeos sintetizados a partir das seqüências parciais obtidas. A seqüência completa do componente viral de pUb1-49 é apresentada na Figura 11. A seqüência completa do clone pUb1-62 é apresentada na Figura 12, e a seqüência completa do clone pUb1-81 é apresentada na Figura 13.

Os resultados da análise comparativa das seqüências completas dos componentes virais clonados em pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 com as seqüências de outros geminivírus estão apresentados no Quadro 10. As prováveis regiões comuns (RC) dos clones pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 foram identificadas por meio de análise comparativa com RCs de geminivírus previamente caracterizados (Figura 14). Por meio dessa análise foi possível identificar elementos *cis* conservados que contribuem para o reconhecimento da

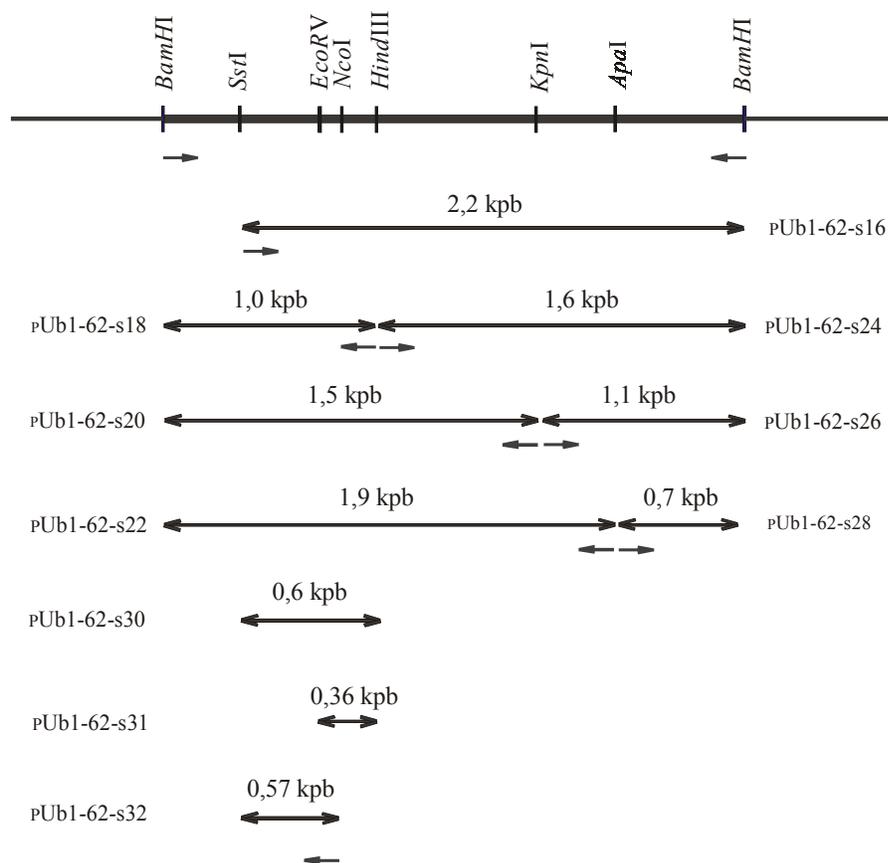


Figura 9 - Estratégia de seqüenciamento do inserto viral em pUb1-62. As setas bidirecionais indicam os subclones, com seus nomes na lateral e os respectivos tamanhos acima. As setas unidirecionais indicam a direção do seqüenciamento.

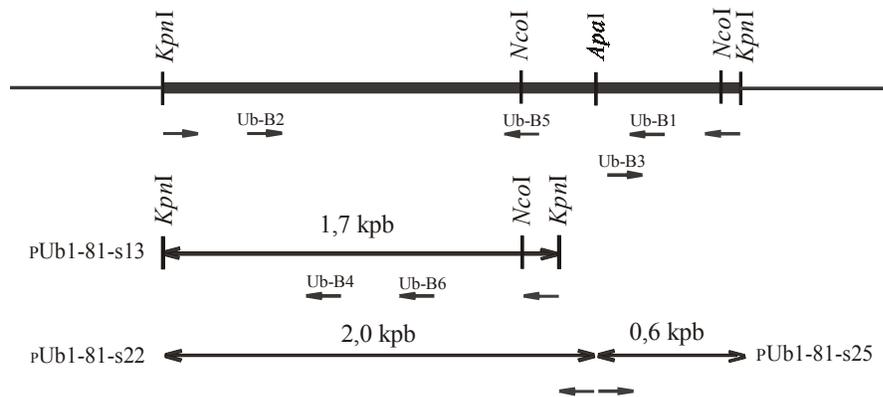


Figura 10 - Estratégia de seqüenciamento do inserto viral em pUb1-81. As setas bidirecionais indicam os subclones, com seus nomes na lateral e os respectivos tamanhos acima. As setas unidirecionais indicam a direção do seqüenciamento, e as setas com seus respectivos nomes acima posicionam os oligonucleotídeos sintetizados para completar o seqüenciamento.

origem de replicação de geminivírus. Particularmente relevante é a presença da seqüência conservada 5'-TAATATTAC-3', que corresponde à alça da estrutura em grampo, cujas seqüências inversas de pareamento estão destacadas como "stem" na Figura 14. Essa seqüência corresponde ao sítio de clivagem da proteína REP, função essencial para o início de replicação do vírus, e está destacada em negrito nas Figuras 11, 12 e 13.

A análise das seqüências dos componentes genômicos clonados em pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 evidenciou que a organização genética desses componentes é semelhante à organização dos componentes A (pUb1-49) e B (pUb1-62 e pUb1-81) de begomovírus (Figura 15). Foram identificadas 5 ORFs no componente A de pUb1-49 e 2 ORFs em pUb1-62 e pUb1-81. Os Quadros 11 e 12 listam a posição das ORFs nos componentes virais clonados. Com base na comparação das seqüências de suas regiões comuns, concluiu-se que os componentes A e B clonados em pUb1-49 e pUb1-81, respectivamente,

ACCGGATGGCCGCGGATTTTTATAAGGCCATTTAGCATCGGGCCTCTGTTGGGGGCTCTCA
 CCTTTAATTTTATTGAAAATAATTTTGGCCCAATCATGATGCATTTGACGAGCTAAGATATTTA
 GAACTACTTAACGCCCAAGTTGCATAACGGCTATAAATTTAAACGTGCATATGTCGTTAACTTTA
 ATTCAAAATGCCTAAGCGCGATGCCCCATGGCGCCACATGGCTAGTACATCTAAGATTAGCCGG
 GGCGTTAATAATTCTCCACGTGCAGGAGTTGGGCCACGGTCCAACAAGGCCACTGACTGGGTAA
 ACAGGCCCATGTACAGGAAGCCCAAGATATATCGGATGTATAGAACCCCCGATGTTCCAAGGGG
 TTGTGAAGGCCCATGTAAAGTCCAGTCGTTTGAACAGCGTCACGATATCTCCATACTGGTAAAG
 GTGATGTGCGTCTCCGATGTGACACGTGGTAACGGTATTACACACCGTGTGGGTAAAGCGTTTCT
 GTGTTAAGTCTGTGTATATTTCTGGGTAAGATATGGATGGATGAGAACATCAAGTTGAAGAACCA
 CACGAACAGTGCCATGTTCTGGTTGGTCAGGGACCGTAGACCGTATGGTACCCCTATGGACTTT
 GGCCAGGTGTTTAAACATGTTTCGACAACGAGCCTAGCACCGCCACTGTGAAAAACGATCTCCGTG
 ATCGTTTTCAAGTCATGCATAAGTTCTATGCTAAGGTCACAGGTGGACAATACGCAAGCAACGA
 GCAGGCGCTTGTCAAGCGGTTCTGGAAGGTCAACAATCATGTGCTCTACAACCATCAAGAAGCT
 GGAAAATACGAGAATCATACGGAGAACGCCCTATTATTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCAA
 ACCCCGTGTACGCAACTTTAAAAATTCGGATCTATTTTTATGATTTCGATAACAAATTAATAAAT
 TTTGACTTTTATTGAATGATTCTCGAGTACAGCATTTACATATTGTCTGTCTGTTGCGAAGCGA
 ACAGCTCTAATTACATTATTAACGAAATAACGCCCTAGCTGATCTATGTACAACATAAGTAAAT
 ATTTAAATCTATTTAAATATGTCATCCCAGAAGCTCTCAGGGATGTGCTCCAGATTTGGAAGTT
 GAGATAAGCCTTGTGGAGACCCAGTACTCTCCTCAGGTTGTGGTTGAACCGTATTTGGACGTGG
 TAGACTCTGGTCCTCGTGTATAGTATGTCTCGACGTTGTACATCTTGAATAAAGGGGATTTG
 ATATTTCCCAAGTATACACGCCATTCTCTGCCTGATGTGCAGTGATGAGTTCCCCTGTGCGTGA
 ATCCATGTCTGCGCAATCTATGTGTACGAAAATGGAGCAGCCGCACTGTAAATCAATTCGTCT
 TCTTCGTATAGCTCTCCTCTTAGCAGCCCGATGTTGAACTTTGATAGAGGGGGGAGTTGAGGAA
 GATGAATTGTGCATTGTGCTTTGTCCAACACTTAATGCTGAGTTCTCTTTTGTGCGAGGAAA
 CATTTATAGCTGGCCCCCTCGCCAGGATTGCAAAGCACGATGCATGGGATACCACCTTTAATTT
 GAACTGGCTTTCCGTATTTACAGTTTGATTGCCAATCCCTTTGGGCCCAATCAATTCCTTTCCA
 GTGCTTTAACTTTAGATAGTGCAGTGCATGTCATCGATGACGTTATATTCAACATGATTTGAA
 TAAACCCTAGGATTGAAATCGAGGTGACCACTCAAATAATTATGGGCCCTAATGCACGTGCC
 ACATCGTCTTTCCCGTTCGAGAATCACCTTCAATGATGATACTAATAGGTGCTTCCGGCCGCGC
 AGCGGCACCTCTCCAAAAATAGTCATCTGCCAATCTTGCATCTCTCTCGGTACGTTAGTGAAA
 GAGGAGAGGGGAAACGTAGGGGCCCATGGCTCCGGAGCCCTTGCAAATATCCTATCTAAATTAC
 TATTTAGATTGTGAACTGAAATAAGAACTTTTCCGGCATCTTCTCCCGGATTATCTGCAAGGC
 GATGTCTTTGGAAGGTGCGTTCAAGGCTTCTGCGGCAGCGTCGTTAGCTGTCTGGCAACCGCCT
 CTAGCACTTCTGCCGTCGATTTGGAATTCACCCCATTCGATAGTATCTCCGTCCTTGTGACAT
 AGGACTTGACGTCGGACGATGATTTAGCTCTCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGTTGACCTTGT
 TGGGGAGACCAGGTCGAAGAATCGTTGATTTTGGCAGCAGTAGTTGCCTTCGAATTGAAGAAGC
 ACATGGAGATGAGGCTCCCCATTTTCATGGAGCTCTCTGCAAACCTTTGATGAACCTTCTATTTG
 TAGGAGTGTTTAGGTTTTTCAATTGGGAAAGTGCTTCTTCTTTTCGATATTGAGCATTGTTGGATA
 TGTTAGGAAATAATTTCTGGCTTTTATTTGAAAGCGCCTTGTAGCTGATGGCATATTTGTAAT
 ATGACCCTTACTACCAATTGGTAGCTGCTCTAAAACCTCATATGAATTGGTAGTTATGGTAGCTC
 TTATATACTAGAAGTTCCTTTAAGGAGATTGCTACACGTGGCCGCCATCCGATATA**TAATATT**

Figura 11 - Sequência completa de nucleotídeos do componente A clonado em pUb1-49. A posição +1 está localizada no nonanucleotídeo que contém a origem de replicação da fita viral. Esta sequência foi depositada no GenBank com o número de acesso AF291705.

ACCGGATGGCCGCGCGATTTTTTTTTTGGTGGACCCATCTTGAAATTGATTGAGCGCATTTTTGA
 CGTCCGCGAATTGAGTTGAGCGCAATATTTTCAGTTCCGTCAATATAGTTAGTGGACTAACTTTA
 ATTTGAAATAAAGTATATCTTTTTGTGTAAACCAATCAGTATGCGGCTATAGAGTCTAAGTTATG
 TATTACATTGATGTGATTTCAAATTCGTATAATAATGTCGAGTACCACTACTTTAGCTGATATT
 TTCAATATTTATGTCATTGTCAAGATGTACGGTATTCATGACGTGGACCAATTAATTGTTTCGCC
 ATGGAGTCTAATTAACATAATATGAAATGATGATTTTTAATAATAAATTCATAGATATTGTGA
 TAGATATGATATCGCATCATGTCTCCTACTCGGTATAGACGTGGTTGGGCGTCTACTCAACGAC
 TAGGTTATTCACGTCAATATTTGTTCAAACGTCTTATTATTGTAAACGTTCTGATGGGAAATA
 CCGATCGGGTAACTCTAATCAGGTCAATGAGGATAATAAGTTGTCGCAACAGCGTATACATGAG
 AACCAGTTTGGTCCAGAATTTGTAATGGGTCAATAACAGCAGTATCGACCTTTTACTCTTTTC
 CTAGTTTATCTAAAACGAACCGGGCAGATCCAGGGCATATATTAAGTTGAAACGTTTACGTTT
 CAAAGGTTACTGTCAAGATTGAGCGTGTTCATGCTGATGTGACTATGGATGGTATAATAACAAAG
 ATTGAAGGCGTATTTTCAGTGGTTGTCGTTGTTGATCGTAAACCCATTTGAGTTCATCTGGAT
 GTCTGCATACATTTGACGAGCTCTTTGGTGCACGGATCCACAGTCATGGCAATTTGGCTATCAC
 TCCATCTTTGAAAGATCGTTTTTATATACGTCACGTTTGGAAAGAAAGTAATATCTGTTGAGAAG
 GATAGTATGATGGTTGATCTTGAAGGAAAGACATCATTGTCTAATAAACGTTTTAATTGTTGGT
 CTGCTTTTTAAGGATCTTGATCGTGATTCATGTAATGGTGTTTATGCGAATATAAGCAAGAACGC
 CCTTTTAGTTTATTACTGTTGGATGTCGGATGCGATGTCTACGGCGTCTCATTGTTATCGTTC
 GATCTTGATTATGTTGGTTAACTATTAATAATTAATGTATTTATATTTACATGAGAAAAATAAT
 TTATTTAAGAAAACGTAATCACATAATATAATTTATTTACTGAAACTTCGGCTGCGCAGCTGC
 ATGCAAAAAAAAAAATATTGGCAACTTGATATTTATTTCAATGATTTGGGCTGTGGAGGAATACAG
 TTAGTTTTAATACATTCTTGTACTGTTGACCTAACAAGATCGTTTAATTGGGCCATTGACAGTG
 TGATGTTGGATTGCGTCTTTGGGCCCAATCATTGAAGCCGAATCACCTGGATCTAATATGGC
 AGTACCTAACCTATTTAGATCTTTGTATGGATGTAACGCCTCCCCTAGGTCTGATTGGGCTTCT
 ATTTGGGCCGTCTCTATTGTACTCCTTGTGGCCCATGACTCTCCTGGATTTAGTTCATTGGGC
 CATGAAGCCCAAATCTTGAAGTTGATGCCGATCTTATCAATTTTCTCTCCCCTTTCCATAACC
 TACATGAGAGAAGTCAATGTCATTGACGGTAAATTTGTTGGACATTATTTTCACTGTGGGTGCC
 CTGAAAGGTATATCAACGGAAATGTTTTGCCGTTGATAGCTTCAATTTTCTTTGAATTTGCGA
 AGTGCATCATCTGATGAACGTTTCGAGTCAGAAACCTTATAATATAGCTTCCATGGAATTGGGTC
 TTTGAGTGAGAAGAATGATGATGAGAAATAGTGGAGATCTATGTTGCATCTGATTGGAAAAGTC
 CATGACGCTTGTAAAGGATTCATTTTCAGTCATCCTTTTGTGATGAATCTCCACAATTAATGATC
 CTGTTGCGTTGATTGGTACCTGTTGTCTATATTTCTATGACGCAATGATCAATCTTCATACAGCT
 TCGATTTAGTCTTGCACTAATGAGTTGCTTTTGTGATGGAAATTGCAATATGATTTCCGGTAAGG
 TCATGAGATAGTTGATATTCATCACGCCGAGATTCTATATAATTAAGGCGTTGGGTGGGCAAA
 CTACTTGAGAGTCCATATGTATTACAAGATTGAATAAGTGGAGAGAATAAGTTAGAATAAGTTA
 AGGAAATTGTAGTAGTGATAGATAAGATGAGTGAATGGCTGTGATATTATAAAGAATTGTGAT
 TCTTATATAGACGCTTTTCTGGGTATGGATAACTTGGCTAAATAATAATGAGTATAAATACTAA
 TTAAGCTTATAAAATTTACAGTGAAACGCTTTGGTTGTGGTATTTATGTAATAAAGGAGATGAG
 ACCCGATAGCTCTCCTTCAAACCTTGGCGAAATGAATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGA
 GACCATTATAGAATATAATTGCCACGTGGCGGCCATCCGCTA**TAATATT**

Figura 12 - Sequência completa de nucleotídeos do componente B clonado em pUbl-62. A posição +1 está localizada no nonanucleotídeo que contém a origem de replicação da fita viral.

ACCGGATGGCCGCCCGATTTTTCTTATCTGCTACGTGGCGAAATCGTGTACGTTGCCTCGCGCT
 TTCCATTTTAATTGAGCGCTTTTTGAAGTCCGCGAAATGAGTTAATTGTCTTTTTGAAATCCG
 CTGTTTATGAATCACCTTTAATTTGAATTAAAGGTTGGATAGTTCGTATTGATCAATCATTTTCG
 CTGGTTTATTTCCCTGTCGTGGTGAATTACAACCGTTCGTTAAAAATATAAGAAATTTACGACG
 TGGACTGTCTAAATTTTATCTACATAGTTAATTTGACAAATGAATGCATATTTAAACTCTGCTT
 TCGTGTGGGTTTACACCACGTCTATACATATTGTCCAGGTTATTTTGTCTAAGTATAATTTATA
 TTTTGTCTTATCTTATTATCTGAACATGTATCCCATTAAGTATAGACGTGGAATGTTGTTTAAAT
 CATCGACGAGGTTACTCATCTAATCCCGTGTTTAAGCGTTTACACGGAGCGAAACGAAGTGATT
 TCAAGCGTCGTTTCGAGTAATCAGATTAAGAGCATGGATGAGACTAAAATGTCTGTTTCAGCGGAT
 TCATGAGAACCAGTTTGGCCCTGAATTTGTAATTGGCCACAATTCTGCCATATCCACATTCATT
 ACATTTCCCTACTCTTTGTAAGACTGTCCCGAACCGTTGTAGGTCATACATAAAGTTAAGACGAC
 TACGTTTTAAAGGAACAATCAAGATTGACCGTGTTCATGCTGAGGTGAATATGGACGGTACAAG
 TCCAATGATTGAAGGAGTCTTCTCTCTGGTTGTAGTCGTTGATCGCAAACCTCATTTGGGCTCA
 TCTGGAACCTGCAATCTTTTATGATGAGATATTTGGTGCAAGGATTCATAGCCATGGTAACCTGG
 CAATAGTATCATCTCTGAAAAGAGCGTTTTTACATACGTCACGTTTGGAAAGAAAGTAATATCTGT
 TGAGAAGGATACAACCATGGTTGATGTTGAAGGAAGTACTATTTTATCTAACAGGCGTTTTAAT
 TGTGGTCATCCCTTTAAGGATATTGACCGTGAATCATGTAATGGTGTATGCAAAACATAAGCA
 AGAACGCCCTGTTAGTTTATTACTGTTGGATGTCTGATAATGTGTCTAAGGCATCGACATTTGT
 ATCATTTGATCTTGATTATGTTGGTTAAATAGTAAGTGAATACGTGATTAGTAATAATGTTTA
 ACTCGCTTTAATAATAAATAACAAGTACTTGTTCAGTAATAATGTTCAACTCGCATTAATAACAA
 AAAAAATGTGTATAATAATATAGAATTTATTTTAAAGATTTTGGCTGTGAAGGAGTACAGTTGC
 TGTTTATACATTCATGGGCCGCTGCTTTAACAAGTTCGTTTAAATTGGGCCATTGACAGTGTAT
 GTTCGATTGGGCCCTTTGAGCACCAATTACGGACGAGCAATCACCTGGGTCTAATGTGCCTGTA
 CCCAGTCTATGTAATTGTCTGTATGGATGCATCGCGTTCTCTATATCTGAGCCCCCTCTGATG
 GGCTTAAGCCTACAGTACTTCTAACAGCCATGACTCTCCGGCATTATTTCAAGTGGGTGTG
 AAGGCCAATCTTGATATTGAGGCGGATCTGATCATCTTCCCTTTCCATTTGCCATAGCCTACG
 TGAATGAAATCAATGTCTTATCTGTAAATTTGTTTTGAAAGGATCTTCACCGTTGGGGCACGGA
 AAGGTATATCAACCGAATGTTTAGCCGTCGAGAGTTTTAGTCTCCCTTTGAATTTAGCGAAGTG
 GGTACTCTGGTGAACGTTTCGTGTCACATACTCTGTAGTACAATTTCCATGGAATTGGGTCCCTTA
 AGGGAGAAGAACGACGACGAAAAGTAGTGAAGATCTATGTTACATCTGATAGGAAAGGTCCACG
 ACGCCTGTAGTGATTTCATTTTCCGTCATTCTTCTGTCTATGAATCTCCACTATAACTGAACCTAC
 GCGTTAATTGGTACCTGTTGTCTGTATTCTATTACGCAATGGTTCGATTTTTCATACAGCTACGA
 CTAAGCCTTGGCCTTAATTGAGACGCCGTTGAAGGGAATTGAAGCATAATCTCGGTTAGATCAT
 GGGAAAGCTGATATTCATCACGCTTAGATTCTATATAATTAATGCGTTGGGAGGATTTACAAG
 CTGAGATTCCATTATTGAAAAATAGGGAGCGCAGCGACAATGTTTGAAGGAAAGTTAATAAGGGAA
 GATGATAATATTTTCGTCAACTGAATATATGACAAGAAAATTTGTCTGTTGATCCAATTGGTAAA
 TTGGAGATGATAATAACTAAAAACGAGGAATCAGGAGAAGACGAATTGAGAGGAGATATTGTC
 TATTTTAGGTGTAATTGATAAATACCCCTCTATTTGCTCTTTAAATAGAATTTTAAAGGCAATG
 GCATATTTGTAAATATGACCCTTACTACCAATTGGTAGCTGCTCTAAAACCTCATATGAATTGGT
 AGTAATGGTAGCTCTTATATAGTAGAAGTTCCCTTTAAGGAGATTGCTACACGTGGCCGCCATC
 CGTTATAATATT

Figura 13 - Sequência completa de nucleotídeos do componente B clonado em pUb1-81. A posição +1 está localizada no nonanucleotídeo que inclui a origem de replicação da fita viral. Esta sequência foi depositada no GenBank com o número de acesso AF291706.

Quadro 10 - Homologia das seqüências de nucleotídeos, em porcentagem, entre o componente A clonado em pUb1-49, o componente B clonado em pUb1-81, o componente B clonado em pUb1-62, e outros begomovírus. Valores para o componente A acima da diagonal, e para o componente B abaixo da diagonal

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	pUb1-49/81	*	-	55	75	79	73	74	69	78	75	70	79	75
2	pUb1-62	70	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	ACMV	21	27	*	54	55	53	53	54	55	55	52	55	55
4	BDMV	56	55	21	*	75	75	75	72	80	85	70	75	81
5	BGMV-Br	65	67	30	55	*	74	74	70	76	74	72	74	73
6	BGMV-DR	56	62	29	65	58	*	97	71	74	76	71	73	74
7	BGMV-GA	55	62	30	65	57	92	*	71	74	75	71	74	75
8	PHV	53	54	21	63	51	62	61	*	69	71	66	69	69
9	PYMV	63	62	20	58	63	56	55	54	*	79	70	76	78
10	SiGMV	54	55	20	77	55	65	64	63	58	*	71	75	80
11	SqLCV	47	52	28	45	48	45	45	47	46	45	*	72	67
12	TGMV	65	65	19	62	64	53	57	56	66	55	55	*	73
13	ToMoV	56	56	30	72	62	66	65	64	59	72	48	57	*

constituem o genoma completo de um novo begomovírus, denominado *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). Dessa forma, o componente A clonado em pUb1-49 passa a ser designado como o componente A do TRMV, e o componente B clonado em pUb1-81 será referido como o componente B do TRMV.

O Quadro 13 indica a porcentagem de homologia das seqüências de nucleotídeos de cada ORF e das proteínas do componente A do TRMV, e o Quadro 14 as homologias do componente B do TRMV e do componente B clonado em pUb1-62.

	<u>Sítio ligação AC1</u>	<u>TATA box</u>
ToMoV-A	GGA-GTATTAGAGTA-AC <u>T</u> TATATAAAGAACCCTCTATAGAACTATTAATC	
ToMoV-B	GGA-GTATTAGAGTA-AC <u>T</u> TATATAAAGAACCCTCTATAGAACTATTAATC	
BGMV-GA-A	GGA-G-<u>ACTGGAGTA</u>-CAAT <u>TATATA</u> CTAGTACCCTCAATCTCGTGAATTATC	
BGMV-GA-B	GGA-G-<u>ACTGGAGTA</u>-CAAT <u>TATATA</u> CTAGTACCCTCAATCTCGTGAATTATC	
BGMV-DR-A	GGA-G-<u>ACTGGAGTA</u>-CAAT <u>TATATA</u> CTAGAACCCTCAATCTCGTGAATTACG	
BGMV-DR-B	GGA-G-<u>ACTGGAGTA</u>-CAAT <u>TATATA</u> CTAGAACCCTCAATCTCGTGAATTACG	
BDMV-A	GGA-GTATTGGAGTT-AC <u>T</u> TATATACTAGAACCCTCAATCT---GG-TT---	
BDMV-B	GGA-GTATTGGAGTT-AC <u>T</u> AAATACTAGAACCCTCAATCT---GG-TT---	
SiGMV-A	GGA-GTATTAGAGTATCCAT <u>TATATA</u> CTACTAGTCTCAATCTT--GG-TT---	
SiGMV-B	GGA-GTATTAGAGTA-CCAT <u>TATATA</u> CTACTTGTGTTTATCTT--GG-TT---	
TGMV-A	GGTAGTAA-GGTAGC-TC <u>T</u> TATATAATTAGAAGTTCCT--AAGGGG-----	
TGMV-B	GGTAGTAA-GGTAGC-TC <u>T</u> TATATAATTAGAAGTTCCT--AAGGGG-----	
pUb1-81-B	GGTAGTAATGGTAGC-TC <u>T</u> TATATAGTAGAAGTTCCTTTAAGGAGA-TT---	
pUb1-49-A	GGTAGTTATGGTAGC-TC <u>T</u> TATATACTAGAAGTTCCTTTAAGGAGA-TT---	
BGMV-Br-A	GGT-GTAATGGTGCC-AA-<u>TATATAGTA</u>AAGAAGTTC TTAAGGATC-TG---	
BGMV-Br-B	GGT-GTAATGGTGCC-AA-<u>TATATAGTA</u>TGAAGTTC TTAAGGATC-TG---	
pUb1-62-B	GGG-GAATGGGTC-TC-AA-<u>TATATAGTA</u>-GAGACCATT TAGAATA-TAA--	
	** * * * * * * * *	

	<u>G box</u>	<u>Stem</u>	<u>Loop</u>	<u>Stem</u>
ToMoV-A	TGGTTCATAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
ToMoV-B	TGGTTCCTAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BGMV-GA-A	AGATTCACAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCCC			
BGMV-GA-B	AGATTCACAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BGMV-DR-A	AGATTCACAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BGMV-DR-B	AGATTCACAC CACGTGGC -GGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BDMV-A	---TCGGAA CACGTGGC -GGCCATCCG-TA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BDMV-B	---TCGGAA CACGTGGC -GGTCATCCG-TA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
SiGMV-A	---TTGATA CACGTGGC -GGCCATCCG-TA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
SiGMV-B	---TTGGTA CACGTGGC -GGCCATCCG-TA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
TGMV-A	----- CACGTGGC -GGCCATCCGTT- TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
TGMV-B	----- CACGTGGC -GGCCATCCGTTT TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
pUb1-81-B	-----GCTA CACGTGGC CGCCATCCGTTA TAATATTAC CGGATGGCCGCCC			
pUb1-49-A	-----GCTA CACGTGGC CGCCATCCGATATA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BGMV-Br-A	-----TAGA CACGTGGC -GGCCATCCGCTA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
BGMV-Br-B	-----GAGA CACGTGGC -GGCCATCCGTTA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
pUb1-62-B	-----TTGC CACGTGGC -GGCCATCCGCTA TAATATTAC CGGATGGCCGCGC			
	***** ** ***** * ***** * ***** * ***** *			

Figura 14 - Análise comparativa da seqüência da região comum de pUb1-49, pUb1-62, pUb1-81 e de outros begomovírus. As seqüências comparadas são delimitadas pela estrutura de grampo (“stem-loop”). O sítio de reconhecimento de REP está presente na região comum. Os elementos *cis* conservados são identificados acima das seqüências alinhadas. Seqüências alinhadas utilizando-se o programa Clustal W.

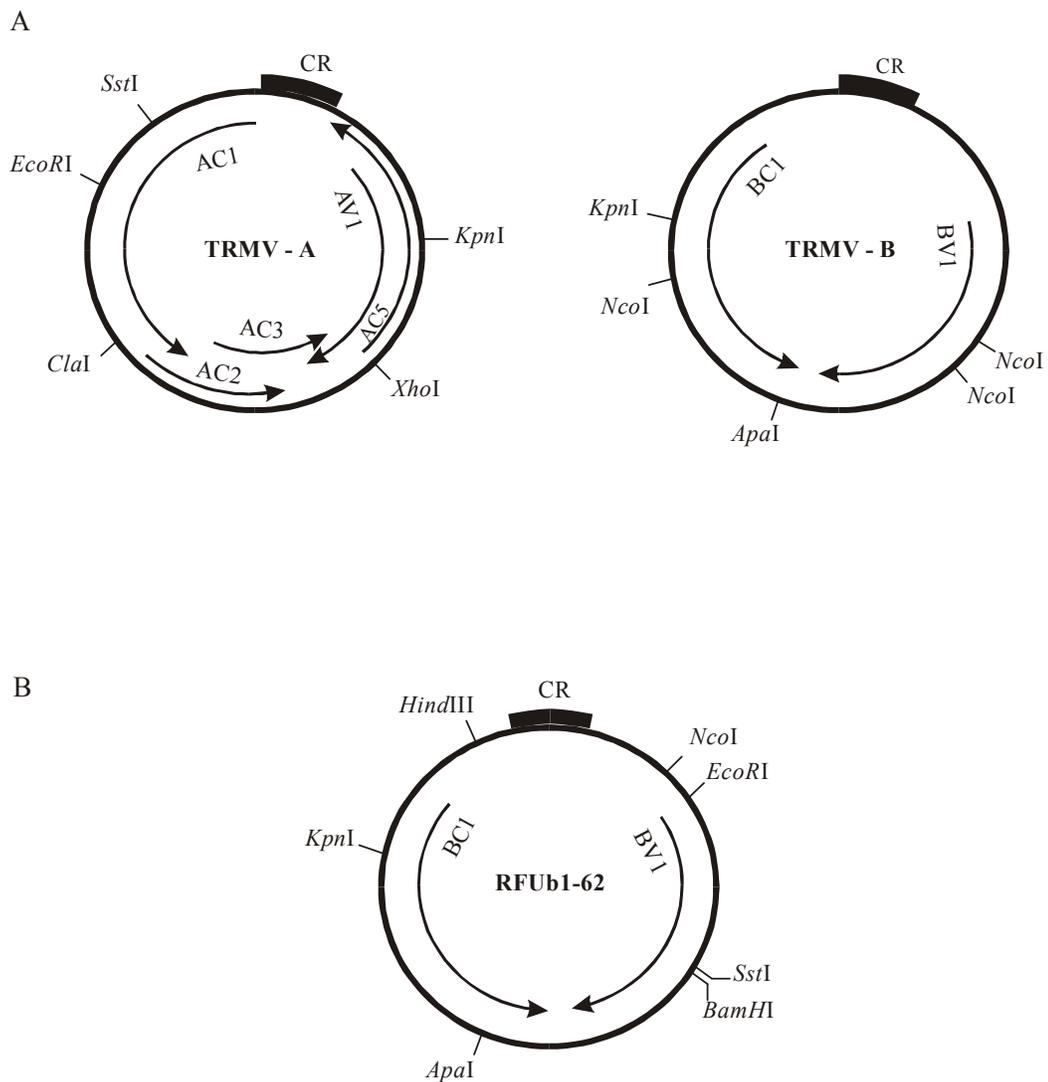


Figura 15 - Mapas dos componentes A e B do TRMV e de pUb1-62. As ORFs codificando proteínas maiores que 10 kDa estão indicadas: AC1, “replication-associated protein”, AC2, “trans-activating protein”, AC3, “replication-enhancer protein”, AC5, sem função definida, AV1, proteína capsial (“capsid protein”), BC1, proteína do movimento (“movement protein”) e BV1, “nuclear shuttle”. CR representa a região comum (“common region”) para ambos os componentes. As posições dos sítios de algumas endonucleases de restrição estão indicadas.

Quadro 11 - Seqüências abertas de leitura (ORF) capazes de codificar proteínas maiores que 10 kDa deduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos do componente A do TRMV

ORF	Fase	Início	Códon de terminação	Aminoácidos
AV1	+3	342	1097	251
AC1	-1	2622	1570	352
AC2	-2	1628	1239	129
AC3	-3	1492	1094	132
AC5	-2	992	240	250

Quadro 12 - Seqüências abertas de leitura (ORF) capazes de codificar proteínas maiores que 10 kDa deduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos do componente B do TRMV (linha superior) e do componente B clonado em pUb1-62 (linha inferior)

ORF	Fase	Início	Códon de terminação	Aminoácidos
BV1	+1	552	1322	256
	+1	403	1173	256
BC1	-3	2330	1449	293
	-3	2192	1311	293

Quadro 13 - Porcentagem de homologia de seqüência de nucleotídeos e aminoácidos entre as ORFs potenciais do TRMV-A, clonado em pUb1-49, e outros begomovírus

	AV1 nt / aa	AC1 nt / aa	AC2 nt / aa	AC3 nt / aa
ACMV	64% / 70%	64% / 63%	- / 52%	- / 50%
BDMV	83% / 89%	73% / 74%	76% / 71%	80% / 75%
BGMV-Br	82% / 91%	79% / 79%	85% / 80%	84% / 80%
BGMV-DR	80% / 88%	72% / 73%	75% / 68%	78% / 70%
BGMV-GA	80% / 90%	72% / 73%	75% / 70%	78% / 71%
CdTV	83% / 91%	73% / 75%	78% / 71%	83% / 80%
PHV	79% / 88%	65% / 63%	62% / 52%	72% / 66%
PYMV	83% / 90%	75% / 79%	79% / 72%	82% / 76%
SiGMV	82% / 90%	73% / 59%	27% / -	73% / -
SqLCV	79% / 89%	64% / 82%	76% / 66%	78% / 73%
TGMV	81% / 89%	81% / 76%	79% / 73%	81% / 77%
TLCV	83% / 91%	73% / 76%	78% / 71%	83% / 79%
ToMoV	84% / 89%	74% / 77%	76% / 68%	81% / 78%
TYLCV-Sar	61% / 72%	68% / 62%	65% / 51%	66% / 50%
TYLCV-Si	61% / 71%	65% / 22%	60% / 51%	66% / 51%

(nt) nucleotídeos.

(aa) aminoácidos.

(-) não determinado.

Quadro 14 - Porcentagem de homologia de seqüência de nucleotídeos entre as ORFs potenciais dos componentes TRMV-B e pUb1-62, respectivamente, e outros begomovírus

	TRMV-B		pUb1-62	
	BV1 nt / aa	BC1 nt / aa	BV1 nt / aa	BC1 nt / aa
RFUb1-62	75% / 72%	77% / 81%	- / -	- / -
ACMV	11% / 27%	36% / 42%	11% / 29%	50% / 44%
BDMV	71% / 71%	74% / 84%	72% / 70%	73% / 79%
BGMV-Br	70% / 70%	75% / 80%	73% / 72%	75% / 78%
BGMV-DR	70% / 68%	77% / 83%	72% / 71%	77% / 83%
BGMV-GA	70% / 67%	76% / 82%	71% / 69%	77% / 82%
CdTV	70% / 70%	76% / 80%	71% / 73%	75% / 77%
PHV	68% / 65%	15% / 17%	70% / 68%	5% / 19%
PYMV	68% / 64%	75% / 80%	69% / 64%	73% / 78%
SiGMV	71% / -	9% / -	73% / -	2% / -
SqLCV	67% / 58%	73% / 77%	67% / 60%	75% / 79%
TGMV	73% / 71%	78% / 85%	74% / 73%	80% / 85%
TLCV	71% / 70%	76% / 81%	72% / 73%	76% / 77%
ToMoV	70% / 69%	74% / 83%	71% / 68%	73% / 79%

(nt) nucleotídeos.

(aa) aminoácidos.

(-) não determinado.

3.4. Análise filogenética

Os genomas e ORFs de alguns geminivírus foram comparados para obtenção de árvores filogenéticas, com o objetivo de classificar taxonomicamente o TRMV e o DNA-B clonado em pUb1-62. Inicialmente, as seqüências completas de nucleotídeos dos componentes virais do TRMV e

pUb1-62 foram comparadas com 24 geminivírus pertencentes aos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus*, e componentes respectivos de *Begomovirus*. As seqüências dos vírus foram escolhidas aleatoriamente, de modo que um pequeno grupo de vírus fosse representativo de um ramo filogenético. As árvores preparadas com base nas seqüências de nucleotídeos de 20 e 14 componentes virais A e B completos são apresentadas nas Figuras 16 e 17, respectivamente. As árvores preparadas com base nas seqüências completas de aminoácidos das proteínas AV1 e BC1 são apresentadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente. As árvores preparadas com base nas seqüências completas de aminoácidos das proteínas AC1, AC2, AC3, e BV1 posicionaram o TRMV e o clone pUb1-62 em agrupamento correspondente ao observado para as proteínas AV1 e BC1 (dados não apresentados).

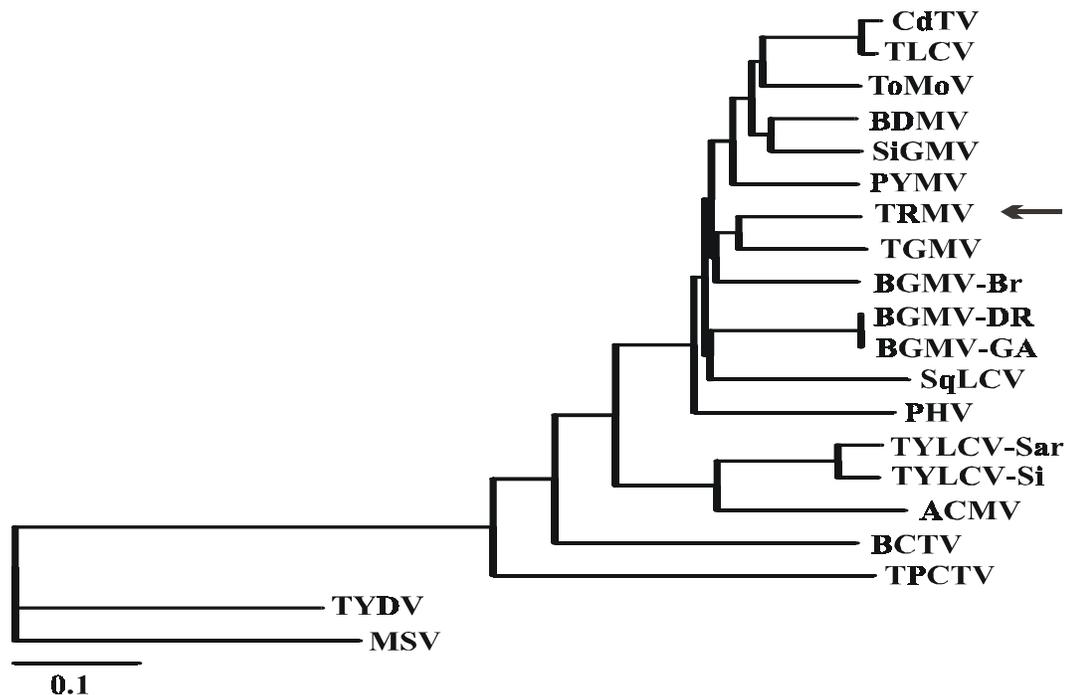


Figura 16 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completos do componente A de geminivírus. O componente A do TRMV, indicado pela seta, se agrupa entre os componentes A de begomovírus.

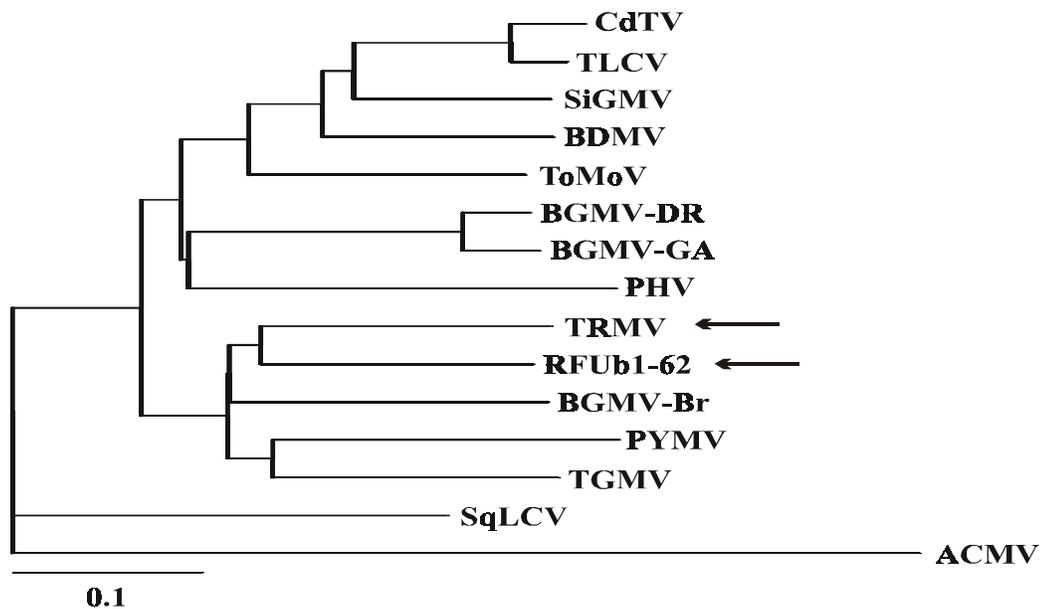


Figura 17 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas de componentes B de begomovírus. O componente B do TRMV e o componente B de pUB1-62 estão indicados pelas setas.

3.5. Caracterização dos demais clones obtidos

Para detectar clones com insertos homólogos ao componente A do TRMV e ao componente B clonado em pUb1-62, foram preparadas as sondas RFUb49-total e Ub49 (A1+496), e a sonda Ub62 (*Nco* I-*Hind* III), respectivamente (Material e Métodos, Quadro 1). A Figura 20 apresenta os resultados de hibridização utilizando a sonda RFUb49-total a 59°C e a 68°C, com DNA oriundo da purificação de plasmídeos recombinantes e da amplificação de DNA com oligonucleotídeos universais para begomovírus. Considerando os clones pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 e o vetor pKS+, observa-se que a sonda RFUb49-total discriminou o inserto presente no clone pUb1-49. Em relação ao DNA amplificado a partir dos isolados virais TRMV, TGV-Ub1-peq, TGV-Ig, TGV-C12 e TGMV, e do complexo viral TGV-Ub1, obtidos de tomateiro, e do

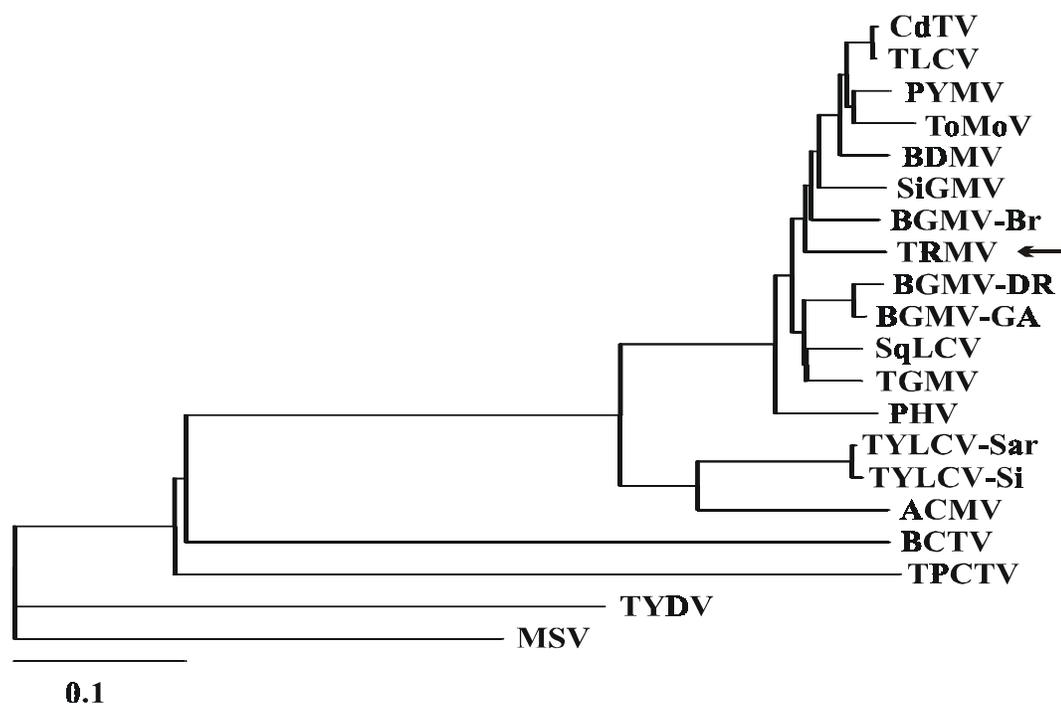


Figura 18 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos completas das proteínas AV1/V1 (CP) de geminivírus. A proteína CP do TRMV, indicada pela seta, se agrupa entre as proteínas CP dos begomovírus do ocidente.

isolado SbGV-RF35, obtido de plantas de soja, observa-se detecção do DNA amplificado a partir do TRMV e de TGV-Ub1, com detecção fraca do DNA amplificado de TGV-Ig. Este padrão de detecção do DNA recombinante e do DNA amplificado por PCR diferiu pouco entre as duas combinações de temperatura e tempo de detecção. Entretanto, o DNA amplificado a partir de TGV-Ig deixou de ser detectado na hibridização a 68°C.

A Figura 21 apresenta o padrão de comportamento da sonda Ub49(A1+496) quando hibridizada a 68°C com DNA oriundo da purificação de plasmídeos recombinantes e da amplificação de DNA com oligonucleotídeos universais para begomovírus. A sonda foi capaz de discriminar o inserto presente

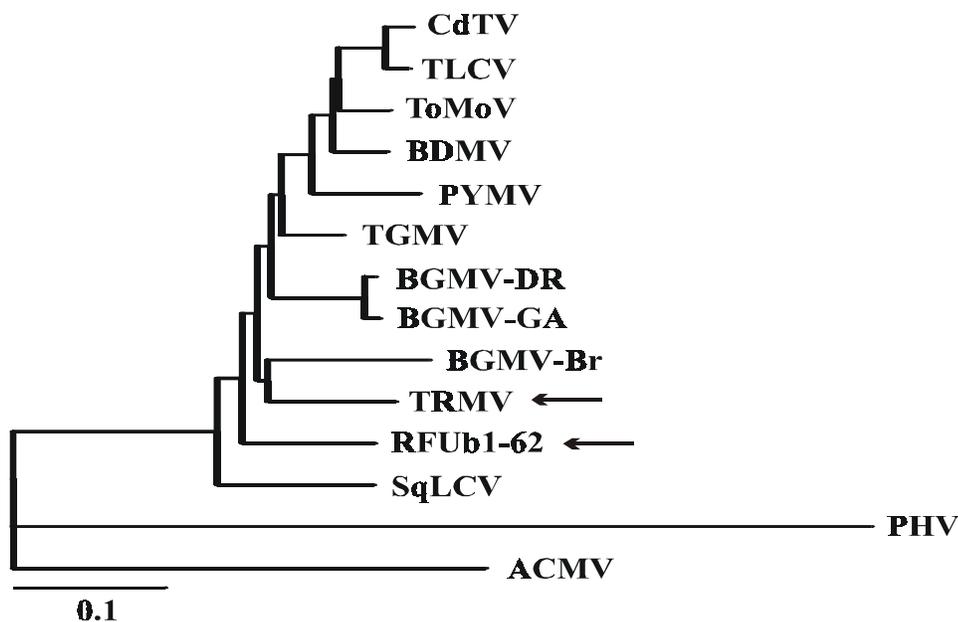


Figura 19 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos completas da proteína BC1 (MP) de begomovírus. As proteínas MP do TRMV e de pUb1-62 estão indicadas pelas setas.

no clone pUb1-49. Quanto ao DNA amplificado por PCR a partir dos isolados TGMV, TGV-Ub1-peq-3 e -7, TGV-Ig e TGV-C12, e do complexo TGV-Ub1, observou-se detecção de TGV-Ub1, e detecção muito fraca de TGV-Ig. A ausência de hibridização da sonda RFUb49-total com o fragmento de TGV-Ub1-peq amplificado fornece evidência adicional para a presença de pelo menos dois genomas virais distintos no complexo TGV-Ub1.

A Figura 22 apresenta o padrão de comportamento da sonda Ub62(*NcoI-HindIII*) quando hibridizada a 68°C com DNA oriundo da purificação de plasmídeos recombinantes e da amplificação de DNA com oligonucleotídeos universais para begomovírus. A sonda é capaz de discriminar entre pUb1-62 e pUb1-81 ou pUb1-49. O Quadro 15 apresenta os resultados das análises de “southern blot” dos 87 clones obtidos a partir do complexo viral TGV-Ub1 com estas sondas.

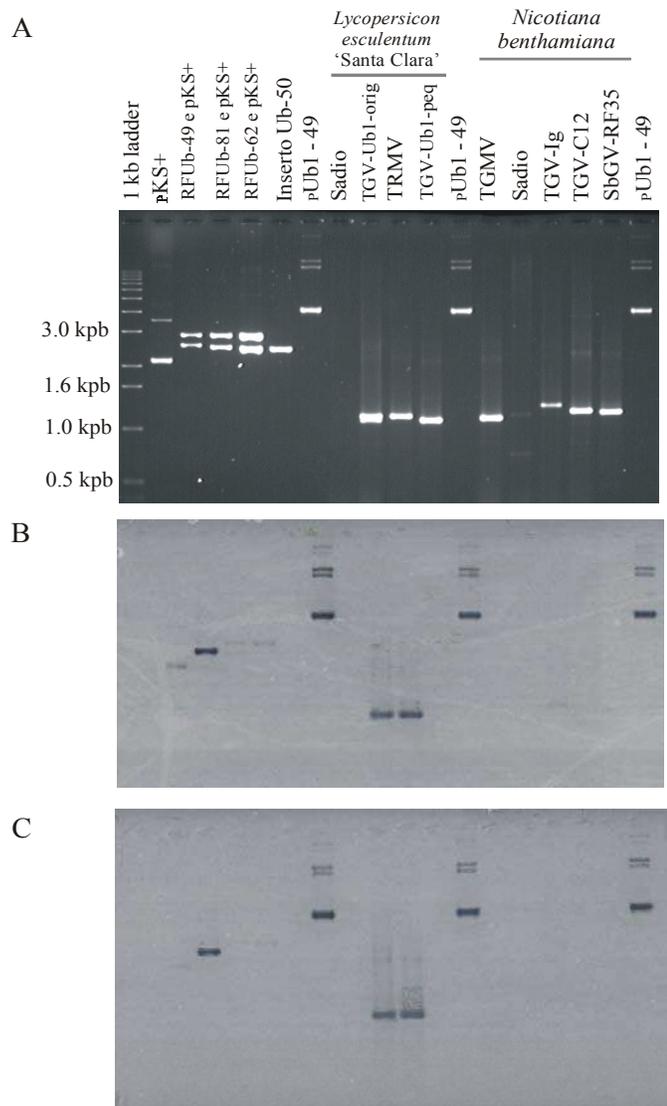


Figura 20 - Resultados da análise da especificidade da sonda RFUb49-total, marcada com digoxigenina. **(A)** Padrão eletroforético do DNA amplificado por PCR e purificado a partir de plasmídeos recombinantes; **(B)** e **(C)** “Southern blot”. **B**, Detecção pela sonda RFUb49-total em hibridização a 59°C/13 horas e detecção por 30 min; **C**, Hibridização a 68°C/13 horas e detecção por 9 min. Forma replicativa viral: RFUb-49 clonado em pUb1-49, RFUb-62 clonado em pUb1-62, e RFUb-81 clonado em pUb1-81; Clone, pUb1-49; TGV-Ub1, complexo de geminivírus obtido de tomateiro em Uberlândia, MG; TGV-Ub1-peq, isolado de geminivírus purificado biologicamente a partir de TGV-Ub1; TGV-Ig e TGV-C12, isolados de geminivírus obtidos de tomateiro em Igarapé, MG e Bicas, MG, respectivamente; SbGV-RF35, isolados de geminivírus obtido de soja; TRMV, *Tomato rugose mosaic virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*. pKS+, vetor de clonagem; 1 kb ladder, marcador.

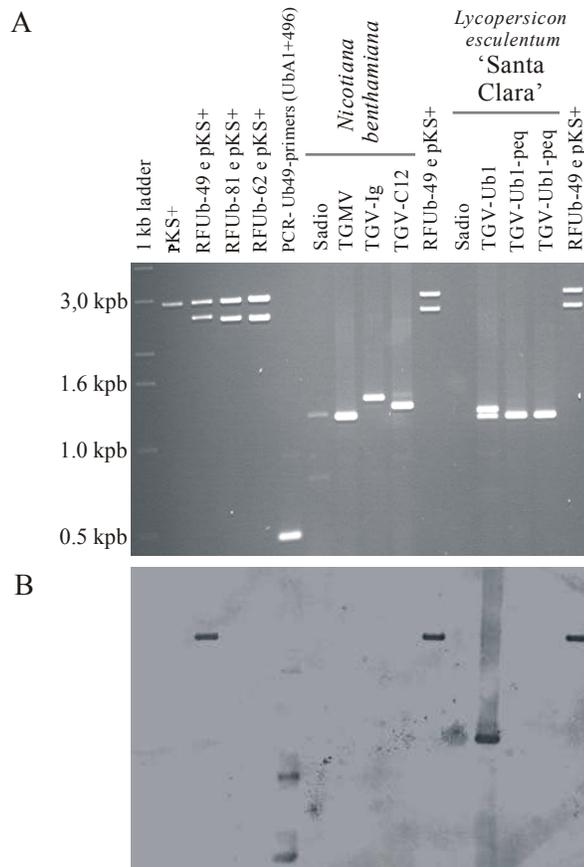


Figura 21 - Resultados da análise de especificidade da sonda Ub49 (A1+496), marcada com digoxigenina. **(A)** Padrão eletroforético do DNA amplificado por PCR e purificado a partir de plasmídeos recombinantes; **(B)** “Southern blot”, detecção de DNA pela sonda Ub49 (A1+496) em hibridização a 68°C/18 horas e detecção por 15 min. Forma replicativa viral: RFUb1-49 clonado em pUb1-49, RFUb1-62 clonado em pUb1-62, e RFUb1-81 clonado em pUb1-81; TGV-Ub1, complexo de geminivírus obtido de tomateiro em Uberlândia, MG; TGV-Ub1-peq, isolado de geminivírus purificado biologicamente a partir de TGV-Ub1; TGV-Ig e TGV-C12, isolados de geminivírus obtidos de tomateiro em Igarapé, MG e Bicas, MG, respectivamente; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; pKS+, vetor de clonagem; 1 kb ladder, marcador.

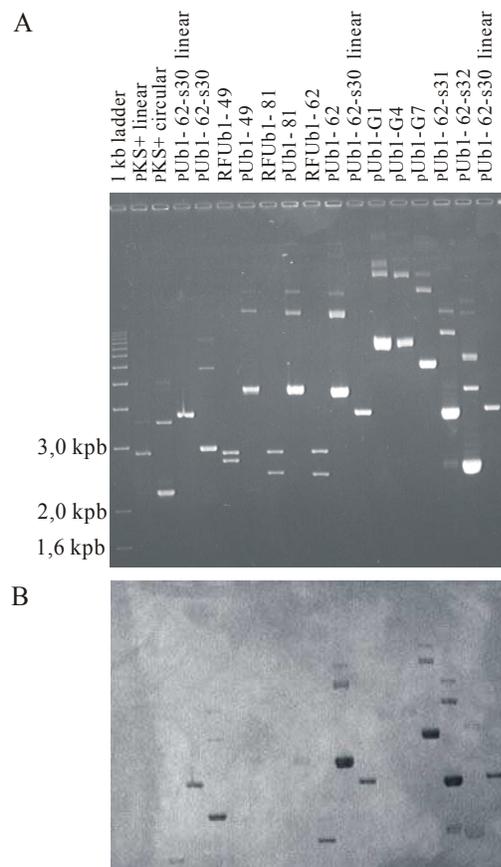


Figura 22 - Resultados da análise de especificidade da sonda Ub62(*Nco* I-*Hind* III), marcada com digoxigenina. **(A)** Padrão eletroforético do DNA amplificado por PCR e purificado a partir de plasmídeos recombinantes; **(B)** “Southern blot”, detecção de DNA pela sonda Ub62(*Nco* I-*Hind* III) em hibridização a 68°C/17 horas e detecção por 10 minutos. Clones: pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81; Subclones: pUb1-62-s30, pUb1-62-s31, e pUb1-62-s32; Clones 1,5 cópia: pUb1-G1 (1,8× pUb1-49), pUb1-G4 (1,4× pUb1-62), e pUb1-G7 (1,75× pUb1-81); Forma replicativa viral: RFUb1-49 clonado em pUb1-49, RFUb1-62 clonado em pUb1-62, e RFUb1-81 clonado em pUb1-81; pKS+, vetor de clonagem; 1 kb ladder, marcador.

Quadro 15 - Resultados da análise de “Southern blot” de clones obtidos a partir do complexo viral TGV-Ub1, utilizando sondas não-radioativas.

Clone	Sítio de clonagem	Sondas ^{ab}		
		TGV-BZ-A- <i>EcoR</i> I 58°C	Ub49 (A1+496) 68°C	Ub62 (<i>Nco</i> I- <i>Hind</i> III) 68°C
PUB1-01	Xho I	-	+ (<)	-
PUB1-02	Xho I	+	+	-
PUB1-03	Xho I	+	+	-
PUB1-04	Xho I	+	+	-
PUB1-05	Xho I	+	+	-
PUB1-06	Xho I	+	+	-
PUB1-07	Xho I	+ (*)	Não testado	Não testado
PUB1-08	Xho I	+	+	-
PUB1-09	Xho I	+	+	-
PUB1-10	Xho I	+	+	-
PUB1-11	Xho I	+	+	-
PUB1-12	Xho I	+	+	-
PUB1-13	Xho I	+	+	-
PUB1-14	Xho I	+	+	-
PUB1-15	Xho I	+ (*)	+	-
PUB1-16	Xho I	+	+	-
PUB1-17	Xho I	+	+	-
PUB1-18	Xho I	+	+	-
PUB1-19	Xho I	+	-	-
PUB1-20	Xho I	+	-	-
PUB1-21	Xho I	+	+	-
PUB1-22	Xho I	+	+	-
PUB1-23	Xho I	+	-	-
PUB1-24	Xho I	+	-	-

(a) Material e Métodos, Quadro 1; (b) sonda marcada com digoxigenina; (+) detectado pela sonda; (-) não detectado pela sonda.; (*) detecção com menor intensidade quando comparado à mesma sonda, mesmo ensaio e quantidade de DNA similar de outro clone.

Quadro 15, Cont.

Clone	Sítio de clonagem	Sondas ^{ab}			
		TGV-BZ-A- <i>EcoR</i> I 58°C	pTG1.4B 58°C	Ub49 (A1+496) 68°C	Ub62 (<i>Nco</i> I- <i>Hind</i> III) 68°C
PUB1-25	BamH I	Não testado	+ (*)	-	+
PUB1-26	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-27	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-28	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-29	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-30	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-31	BamH I	Não testado	+ (*)	-	+ (*)
PUB1-32	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-33	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-34	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-35	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-36	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-37	BamH I	Não testado	+ (*)	-	+ (*)
PUB1-38	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-39	BamH I	Não testado	+	-	+
PUB1-40	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-41	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-42	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-43	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-44	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-45	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-46	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-47	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-48	BamH I	Não testado	-	-	-
PUB1-49	<i>EcoR</i> I	+	Não testado	+	-
PUB1-50	<i>EcoR</i> I	+ (*)	Não testado	-	-

(a) Material e Métodos, Quadro 1; (b) sonda marcada com digoxigenina; (+) detectado pela sonda; (-) não detectado pela sonda; (*) detecção com menor intensidade quando comparado à mesma sonda, mesmo ensaio e quantidade de DNA similar de outro clone

Quadro 15, Cont.

Clone	Sítio de clonagem	Sondas ^{ab}			
		TGV-BZ-A- <i>EcoR</i> I 58°C	pTG1.4B 58°C	Ub49 (A1+496) 68°C	Ub62 (<i>Nco</i> I- <i>Hind</i> III) 68°C
PUB1-51	<i>EcoR</i> I	-	Não testado	-	-
PUB1-52	<i>EcoR</i> I	-	Não testado	-	-
PUB1-53	<i>EcoR</i> I	+	Não testado	+	-
PUB1-54	<i>EcoR</i> I	-	Não testado	-	-
PUB1-55	<i>Sst</i> I	+	-	+	-
PUB1-56	<i>Sst</i> I	-	+	-	+
PUB1-57	<i>Sst</i> I	-	+	-	+
PUB1-58	<i>Kpn</i> I	+	+	-	-
PUB1-59	<i>Kpn</i> I	-	+	-	+
PUB1-60	<i>BamH</i> I	Não testado	-	-	-
PUB1-61	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-62	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-63	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-64	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-65	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-66	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-67	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-68	<i>BamH</i> I	Não testado	+	-	+
PUB1-69	<i>BamH</i> I	Não testado	-	-	-
PUB1-70	<i>EcoR</i> I	+	-	+	-
PUB1-71	<i>Sst</i> I	+	-	-	+
PUB1-72	<i>Sst</i> I	+	-	+	-
PUB1-73	<i>Sst</i> I	-	+	-	+
PUB1-74	<i>Kpn</i> I	+	-	+	-
PUB1-75	<i>Kpn</i> I	+	+	-	-
PUB1-76	<i>Kpn</i> I	+	+	-	-

(a) Material e Métodos, Quadro 1; (b) sonda marcada com digoxigenina; (+) detectado pela sonda; (-) não detectado pela sonda; (*) detecção com menor intensidade quando comparado à mesma sonda, mesmo ensaio e quantidade de DNA similar de outro clone

Quadro 15, Cont.

Clone	Sítio de clonagem	Sondas ^{ab}			
		TGV-BZ-A- <i>EcoR</i> I 58°C	pTG1.4B 58°C	Ub49(A1+496) 68°C	Ub62(<i>Nco</i> I- <i>Hind</i> III) 68°C
PUb1-77	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-78	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-79	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-80	Kpn I	+	-	+	-
PUb1-81	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-82	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-83	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-84	Kpn I	+ (*)	+	-	-
PUb1-85	Kpn I	+ (*)	-	+	-
PUb1-86	Kpn I	+	-	+	-
PUb1-87	Kpn I	+	-	+	-

(a) Material e Métodos, Quadro 1; (b) sonda marcada com digoxigenina; (+) detectado pela sonda; (-) não detectado pela sonda; (*) detecção com menor intensidade quando comparado à mesma sonda, mesmo ensaio e quantidade de DNA similar de outro clone

3.6. Análise da infectividade dos genomas clonados

As plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com pUb1-G1 + pUb1-G4 (TRMV) apresentaram sintomas fracos de mosaico amarelo (Figura 23) a partir da terceira semana após a inoculação. O controle inoculado com TGMV (clones pTG1.3A + pTG1.4B) apresentou sintomas severos de manchas amarelas, deformação foliar e nanismo a partir da segunda semana de inoculação (Figura 23). Aos 45 dias após a inoculação, 29% das plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com a combinação de clones pUb1-G1 + pUb1-G4 apresentavam sintomas de infecção viral (Quadro 16). Nesta mesma época, 100% das plantas inoculadas com TGMV apresentavam sintomas de infecção viral. As

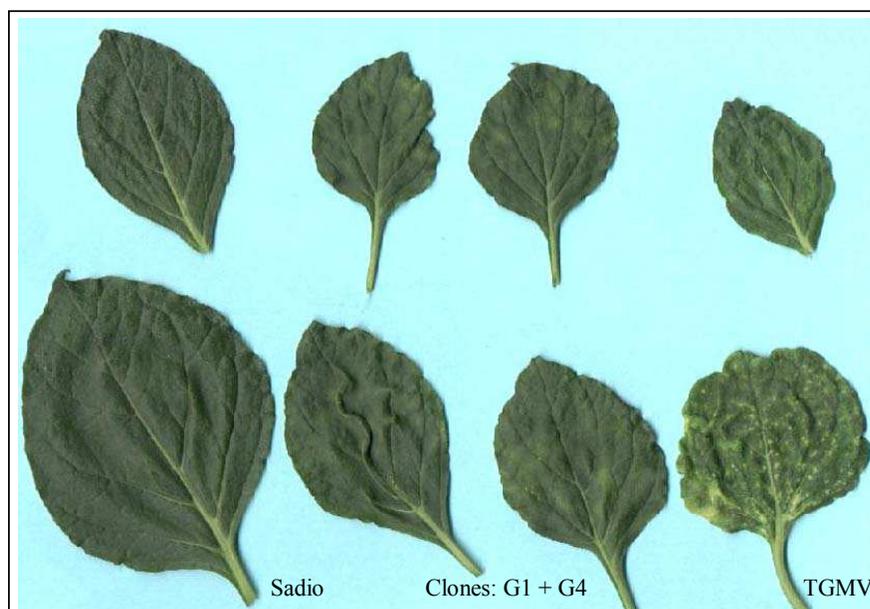


Figura 23 - Sintomas da infecção de *Nicotiana benthamiana* pelos clones pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV) ou TGMV (*Tomato golden mosaic virus*).

plantas inoculadas com pUb1-G1 + pUb1-G7 não apresentaram sintomas sistêmicos nem locais de infecção viral.

A análise via PCR das plantas inoculadas com pUb1-G1 + pUb1-G4 e com TGMV resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 1.200 nt apenas em plantas que apresentavam sintomas (Figura 24). Para a combinação pUb1-G1 + pUb1-G4 observou-se uma proporção de 25% de plantas inoculadas com infecção sistêmica confirmada via PCR (Quadro 16). A amplificação de fragmento viral via PCR a partir de plantas inoculadas com a combinação pUb1-G1 + pUb1-G7 ocorreu em 11,7% das plantas inoculadas, mas apenas quando a extração de DNA foi realizada na folha inoculada.

A sonda RFUb49-total marcada com digoxigenina e hibridizada a 68°C detectou o DNA amplificado via PCR a partir das plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com os clones pUb1-G1 + pUb1-G4 (TRMV)

Quadro 16 - Resultados da amplificação de DNA via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para componente A de begomovírus aos 45 dias após inoculação via biolística com os clones pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7), pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV) ou com TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) em *Nicotiana benthamiana*

Repetição	Sintomas ^a								PCR ^b			
	Sadio		TGMV		pUb1-G1 + pUb1-G7		pUb1-G1 + pUb1-G4		Sadio	TGMV	pUb1-G1 + pUb1-G7	pUb1-G1 + pUb1-G4
		%		%		%		%				
1	0/2	0	3/3	100,0	0/1	0	0/4	0	0/1	1/1	*	0/1
2	0/2	0	2/2	100,0	0/3	0	1/5	20,0	0/1	*	1/1 ^c	1/2
3	#	#	5/5	100,0	0/2	0	1/3	33,3	#	1/1	*	0/2
4	#	#	4/4	100,0	0/3	0	1/5	20,0	#	*	1/1 ^c	1/2
5	#	#	3/3	100,0	0/5	0	3/4	75,0	#	*	*	3/3
6	#	#	1/1	100,0	0/3	0	1/3	33,3	#	*	*	1/1
Total	0/4	0	18/18	100,0	0/17	0	7/24	29,2			2/17 (11,7%)	6/24 (25,0%)

(a) número de plantas com sintomas sistêmicos / número de plantas inoculadas.

(b) número de plantas onde houve amplificação via PCR / número de plantas inoculadas.

(c) positivo para amplificação a partir de DNA extraído do local de inoculação e negativo para amplificação a partir de DNA extraído do ápice da planta.

(*) não testado.

(#) não existe repetição.

pUb1-G1: 1,8× pUb1-49; pUb1-G4: 1,75× pUb1-81; pUb1-G7: 1,4× pUb1-62; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*.

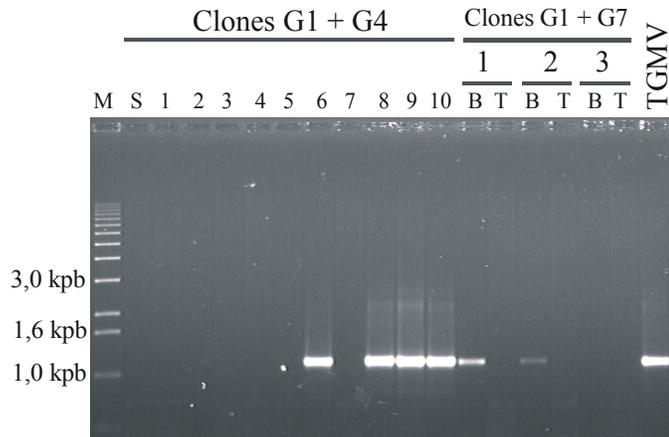


Figura 24 - Fragmento do genoma viral amplificado via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus, em amostras de folhas coletadas próximas ao meristema apical (exceto quando especificado outro local) de *Nicotiana benthamiana* inoculada por biobalística com os clones pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7), pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV) ou com TGMV (*Tomato golden mosaic virus*); T, amostra foliar coletada próxima do topo meristemático apical; B, amostra foliar coletada no local da inoculação por biobalística; S, planta sadia; M, marcador (“1 kb DNA ladder”).

(Figura 25). Nenhum sinal de hibridização da sonda foi detectado com o DNA amplificado a partir de plantas inoculadas com o TGMV.

A análise via PCR de tomateiros inoculados com os clones pUb1-G1 + pUb1-G4 ou com TGMV resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 1.200 nt apenas das plantas com sintomas (Figura 27). Todas as plantas inoculadas com os clones pUb1-G1 + pUb1-G4 e que apresentavam sintomas sistêmicos foram positivas pela diagnose via PCR. Análise dos tomateiros inoculados por biobalística com TGMV resultou em 41% das plantas positivas para infecção viral. A amplificação de DNA a partir de plantas inoculadas com a combinação pUb1-G1 + pUb1-G7 ocorreu em 11,7% das plantas inoculadas, mas apenas a partir de DNA extraído da folha inoculada (Figura 28).

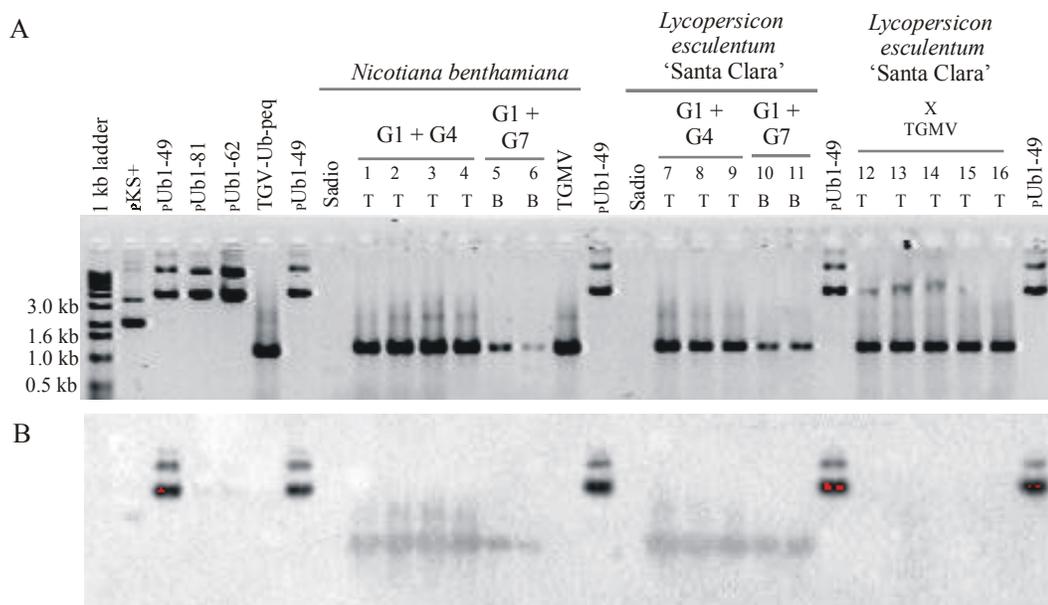
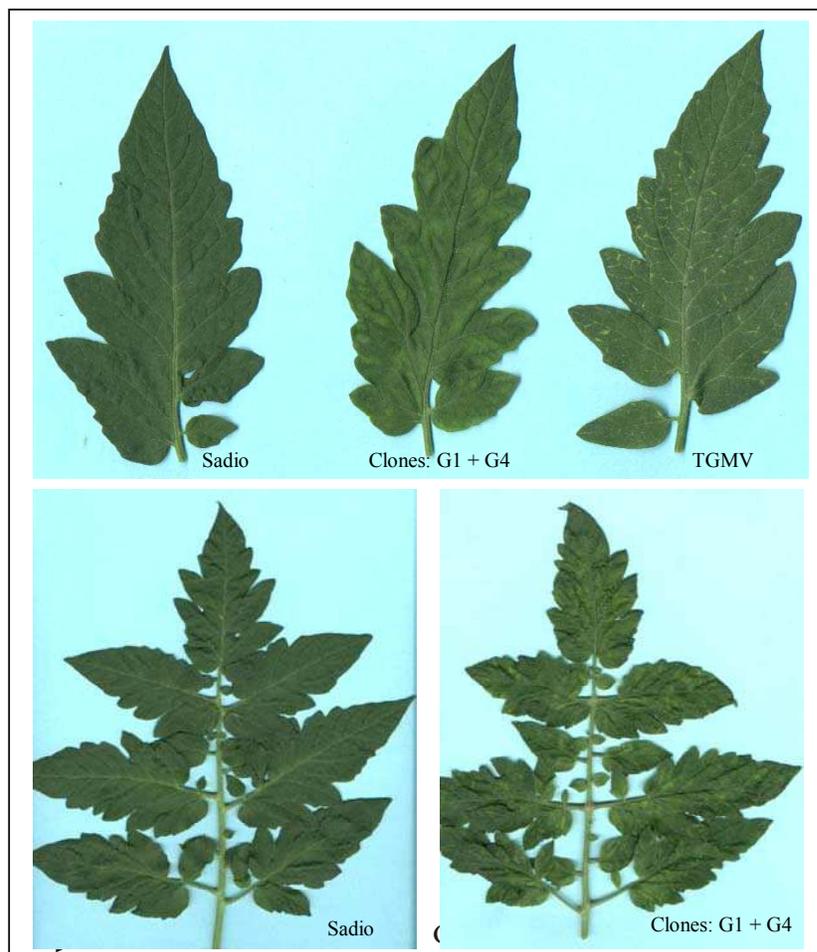
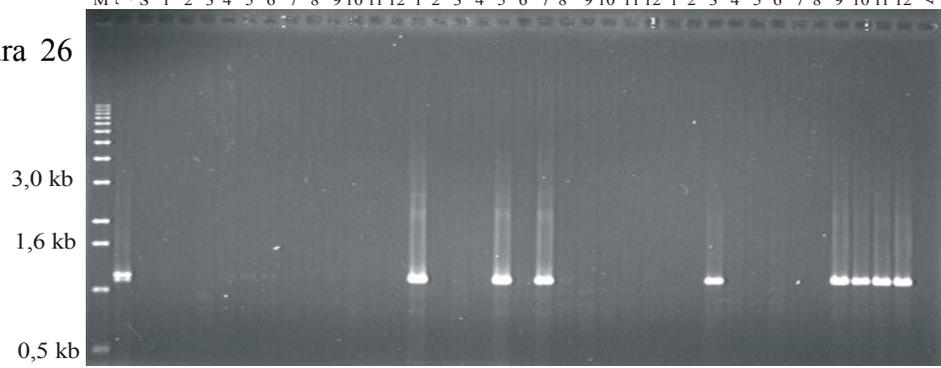


Figura 25 - **(A)** DNA amplificado com oligonucleotídeos universais para componente A de begomovírus a partir de DNA extraído de plantas inoculadas por biobalística com os clones contendo repetições parciais: pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7), pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV) ou com TGMV (*Tomato golden mosaic virus*). Os números (1 a 16) representam plantas diferentes. T, DNA extraído do ápice da planta; B, DNA extraído do local de inoculação. **(B)** Sinal de hibridização com a sonda RFUb49-total marcada com digoxigenina, hibridizada a 68°C por 10,5 h e detecção por 30 min.



MTC S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Agria

Figura 26



ciais:
(G4)
olden
tica.

Figura 27 - Amplificação de DNA via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para componente A de begomovírus em amostras de folhas coletadas próximas do meristema apical de tomateiro ‘Santa Clara’ inoculado com os clones contendo repetições parciais: pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7), pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV), ou com TGMV (*Tomato golden mosaic virus*); S, planta sadia; M, marcador (“1 kb DNA ladder”).

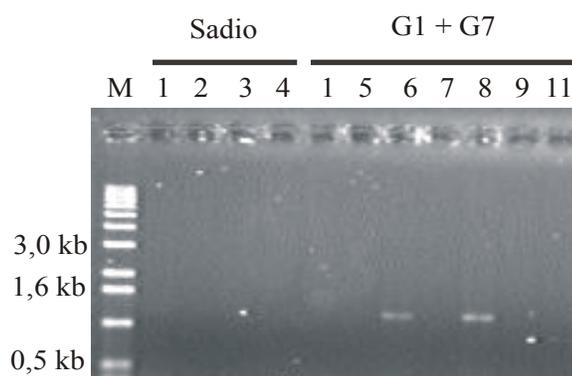


Figura 28 - Amplificação de DNA via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus em amostras de folhas coletadas no local de inoculação de tomateiro ‘Santa Clara’ inoculado com os clones contendo repetições parciais: pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7); S, planta sadia; M, marcador (“1 kb DNA ladder”).

Tomateiros ‘Santa Clara’ inoculadas com pUb1-G1 + pUb1-G4 (TRMV) apresentaram sintomas fracos de mosaico amarelo entre as nervuras secundárias, ligeira redução de crescimento e deformação do limbo foliar (Figura 26) a partir da terceira semana após a inoculação. Aos 32 dias após a inoculação, 25% das plantas de tomate apresentavam sintomas de infecção viral (Quadro 17). O controle inoculado com TGMV apresentou sintomas de pontos amarelos e amarelecimento de nervuras em folhas inoculadas e em algumas folhas desenvolvidas imediatamente após a inoculação (Figura 26), totalizando 50% de tomateiros com sintomas aos 32 dias após inoculação. As plantas inoculadas com pUb1-G1 + pUb1-G7 não apresentaram sintomas sistêmicos ou locais de infecção viral.

A sonda RFUb49-total, marcada com digoxigenina e hibridizada a 68°C, detectou o DNA amplificado com oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus a partir do ápice de tomateiros inoculados com os clones pUb1-G1 + pUb1-G4 e a partir do local de inoculação com os clones pUb1-G1 + pUb1-G7 (Figura 25). Nenhum sinal de hibridização foi detectado com o DNA amplificado de TGMV.

3.7. Caracterização biológica do TRMV

3.7.1. Transmissão do TRMV via extrato vegetal tamponado (EVT)

A partir da segunda semana após a inoculação, plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com o TRMV via EVT (extrato preparado a partir de folhas de *N. benthamiana* inoculadas com os clones pUb1-G1 + pUb1-G4) apresentaram sintomas sistêmicos de infecção viral, porém menos severos do que os observados em *Nicotiana benthamiana* infectada com o TGV-Ub1. No primeiro teste de transmissão, aos 27 dias após a inoculação, 12,5% das plantas de *Nicotiana benthamiana* apresentavam sintomas sistêmicos, e a diagnose via PCR determinou que 37,5% das plantas apresentavam infecção pelo TRMV

Quadro 17 - Resultados da amplificação de DNA via PCR aos 32 dias após inoculação com os clones pUb1-G1 (G1) + pUb1-G7 (G7), pUb1-G1 (G1) + pUb1-G4 (G4) (*Tomato rugose mosaic virus*, TRMV) ou com TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), em tomateiro ‘Santa Clara’, por biobalística

Repetição	Sintomas ^a								PCR ^b							
	Sadio		TGMV		pUb1-G1 + pUb1-G7		pUb1-G1 + pUb1-G4		Sadio		TGMV		pUb1-G1 + pUb1-G7		pUb1-G1 + pUb1-G4	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
1	0/2	0	0/2	0	0/2	0	1/2	50	0/2	0	0/2	0	0/2	0	1/2	50
2	0/2	0	1/2	50	0/2	0	0/2	0	0/2	0	1/2	50	0/2	0	0/2	0
3	#	#	½	50	0/2	0	1/2	50	#	#	0/2	0	1/2	50 ^c	1/2	50
4	#	#	0/2	0	0/2	0	1/2	50	#	#	0/2	0	1/2	50 ^c	1/2	50
5	#	#	2/2	100	0/2	0	0/2	0	#	#	2/2	100	0/2	0	0/2	0
6	#	#	2/2	100	0/2	0	0/2	0	#	#	2/2	100	0/2	0	0/2	0
Total	0/4	0	6/12	50	0/12	0	3/12	25,0	0/4	0	5/12	41,7	2/12	16,7	3/12	25,0

(a) número de plantas com sintomas sistêmicos / número de plantas inoculadas.

(b) número de plantas onde houve amplificação de DNA via PCR / número de plantas inoculadas.

(c) positivo para amplificação a partir de DNA extraído do local de inoculação e negativo para amplificação a partir de DNA extraído do ápice da planta.

(#) não existe repetição.

pUb1-G1: 1,8× pUb1-49; pUb1-G4: 1,75× pUb1-81; pUb1-G7: 1,4× pUb1-62; TGMV, *Tomato golden mosaic vírus*.

(Quadro 18). Aos 36 dias após a inoculação, as três plantas positivas para amplificação de DNA por PCR apresentavam sintomas de amarelecimento do limbo foliar, bandas verdes ao longo das nervuras, ligeira deformação foliar e redução de crescimento.

Quadro 18 - Resultados dos testes de inoculação do TRMV via extrato vegetal tamponado em plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Teste	Sintomas ^a						PCR ^b					
	Sadio		TRMV		TGV-Ub1		Sadio		TRMV		TGV-Ub1	
		%		%		%		%		%		%
1 ^c	0/4	0	1/8	12,5	*	*	0/1	0	3/8	37,5	*	*
2 ^d	0/10	0	1/10	10,0	10/10	100	0/1	0	4/10	40,0	10/10	100

TRMV, *Tomato rugose mosaic virus*.

TGV-Ub1, complexo de geminivírus obtido de tomateiro em Uberlândia, MG.

(a) número de plantas com sintomas sistêmicos / número de plantas inoculadas.

(b) número de plantas positivas para amplificação de DNA via PCR / número de plantas inoculadas.

(c) 27 dias após a primeira de duas inoculações.

(d) 20 dias após a primeira de três inoculações.

(*) não testado.

Nas plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com o TRMV no segundo teste de transmissão por EVT, observaram-se sintomas iniciais semelhantes aos que ocorrerem no primeiro ensaio. Os sintomas foram observados em 10% e 100% das plantas inoculadas com TRMV e com TGV-Ub1, respectivamente. A diagnose via PCR indicou que o índice de infecção pelo TRMV era de 40% (Figura 29).

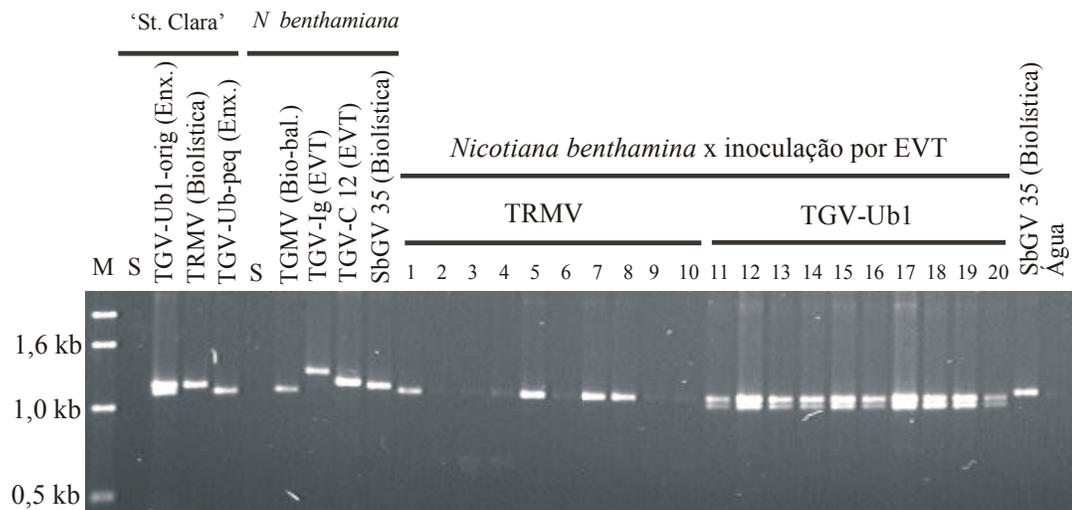


Figura 29 - Amplificação de DNA via PCR a partir de DNA extraído de folhas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas via extrato vegetal tamponado (EVT) com *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; TGV-Ub1, complexo de geminivírus obtidos de tomateiro em Uberlândia, MG; TGV-Ub1-peq, isolado de geminivírus purificado biologicamente a partir de TGV-Ub1; TGV-Ig e TGV-C12, isolados de geminivírus obtidos de tomateiro em Igarapé, MG e Bicas, MG, respectivamente; SbGV-RF35, isolado de geminivírus obtido de soja; St. Clara, *Lycopersicon esculentum* 'Santa Clara'; S, planta sadia; M, marcador ("1 kb DNA ladder").

3.7.2. Transmissão do TRMV por enxertia para *Solanum tuberosum* e *Datura stramonium*

Todas as cinco plantas de *Solanum tuberosum* inoculadas com o TRMV por enxertia de ápice de tomateiro ‘Santa Clara’ infectado por biolística desenvolveram sintomas de manchas amarelas, ligeira deformação foliar e redução de crescimento. A diagnose por PCR confirmou que as plantas de batateira estavam infectadas com o TRMV (Figura 30).

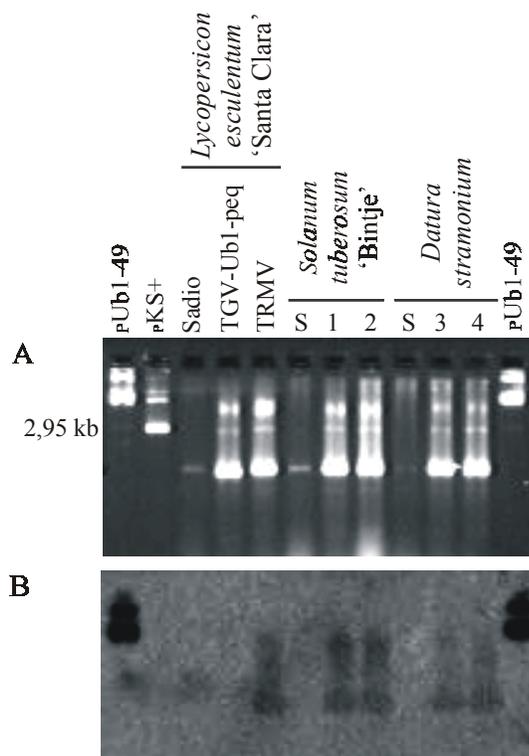


Figura 30 - (A) DNA amplificado via PCR a partir de plantas de *Solanum tuberosum* e *Datura stramonium* inoculadas com o TRMV por enxertia. (B) Sinal de hibridização da sonda RFUb49, marcada com digoxigenina, hibridizada a 68°C por 23 h com detecção por 3 h e 40 min.

A análise via PCR das seis plantas de *Datura stramonium* enxertadas com tomateiro ‘Santa Clara’ infectado com o TRMV indicou a amplificação de um fragmento com aproximadamente 1.200 nt. Nenhum fragmento foi amplificado a partir de planta sadia desta espécie vegetal. As plantas de *Datura stramonium* infectadas com o TRMV não apresentaram alterações de desenvolvimento em relação à planta controle (não inoculada), nas condições e no período de tempo avaliado.

A sonda RFUb49-total detectou o DNA viral amplificado a partir de batateiras e de *Datura stramonium* inoculadas com o TRMV (Figura 30).

3.7.3. Gama de hospedeiros

3.7.3.1. Plantas inoculadas via EVT

Os resultados da análise de “Southern blot” do DNA amplificado a partir de plantas inoculadas com o TGV-Ub1 via EVT estão apresentados na Figura 31. O fragmento de DNA amplificado a partir do componente A do TRMV foi detectado em *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana rustica*, e *Nicotiana tabacum* ‘Sansum’, ‘TNN’, ‘Havana 425’, ‘Xanthi’, ‘White Burley’ e ‘Turkish’ (Quadro 19). Os resultados da análise de “Southern blot” sumarizados no Quadro 19 mostram que a presença do TRMV não foi detectada em algumas plantas de *N. glutinosa*, mas a amplificação de fragmento de DNA indicou que elas estavam infectadas por begomovírus. Este resultado sugere que *N. glutinosa* foi infectada pelo TGV-Ub1-peq, o outro geminivírus presente no complexo TGV-Ub1.

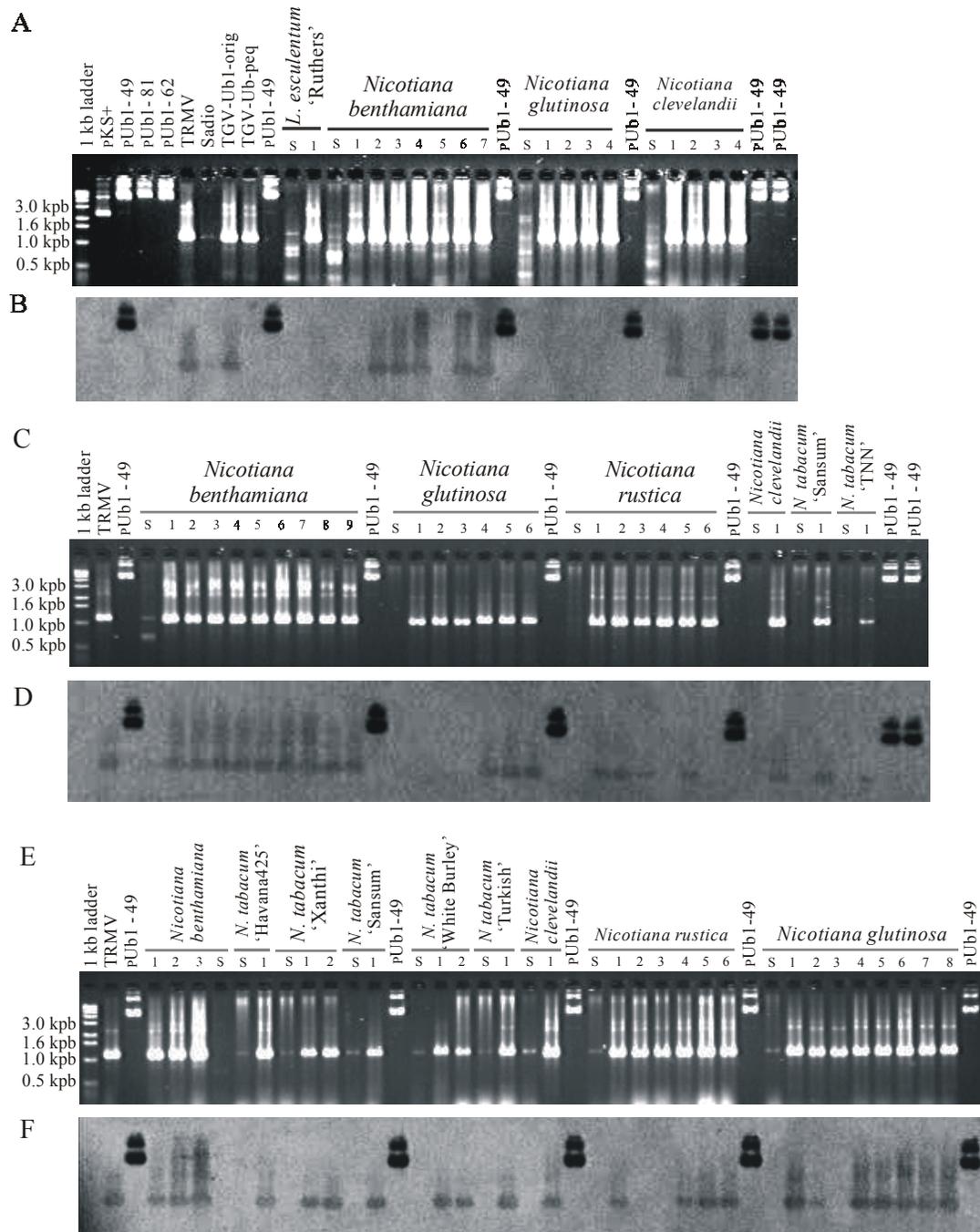


Figura 31 - Detecção do *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV) em plantas inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 via extrato vegetal tamponado. (A), (C) e (E), DNA amplificado via PCR com os oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PAR1c496 a partir de plantas inoculadas com TGV-Ub1; pUb1-49, clone RF obtido a partir de TGV-Ub1; (B), (D) e (F), “Southern blot”: Detecção do fragmento de DNA amplificado a partir componente A do TRMV pela sonda RFUb49-total, marcada com digoxigenina e hibridizada a 68°C por 23 h com revelação por 3 h e 40 min.

Quadro 19 - Resultados da análise de “Southern blot” do DNA amplificado via PCR a partir de plantas inoculadas com TGV-Ub1, utilizando a sonda RFUb49-total marcada com digoxigenina, em hibridização a 68°C

Espécie testada	Método de inoculação			Enxertia
	Extrato vegetal tamponado			
	1º Rep.	2º Rep.	3º Rep.	
<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Rutgers’	0/1	-	-	1/1
<i>L. esculentum</i> ‘Santa Clara’	-	-	-	2/2
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/7	9/9	3/3	#
<i>N. clevelandii</i>	2/4	1/1	1/1	#
<i>N. glutinosa</i>	0/4	3/6	7/8	#
<i>N. rustica</i>	-	4/6	4/6	2/2
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	-	-	1/1	5/5
<i>N. tabacum</i> ‘Sansun’	-	1/1	1/1	5/5
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	-	1/1	-	8/8
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’	-	-	1/1	4/4
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	-	-	2/2	8/8
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	-	-	2/2	6/6

(n/n) número de amostras positivas para hibridização com a sonda RFUb49-total / número total de amostras analisadas.

(-) sem DNA amplificado para ser analisado.

(#) não avaliado para este método de inoculação.

3.7.3.2. Plantas inoculadas por enxertia

Os resultados da análise de “Southern blot” do DNA amplificado a partir de plantas inoculadas com o TGV-Ub1 por enxertia estão apresentados na Figura 32. O fragmento de DNA amplificado a partir do componente A do TRMV foi detectado em *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* ‘Sansum’, ‘TNN’, ‘Havana 425’, ‘Xanthi’, ‘White Burley’, ‘Turkish’, e tomateiro ‘Santa Clara’ e ‘Rutgers’ (Quadro 19).

3.7.4. Detecção dos componentes genômicos do TRMV em hospedeiros alternativos

A análise via PCR de planta de joá-de-capote (*Physalis floridana*) e de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) com sintomas de infecção viral, coletadas próximas de campo de tomateiro no município de Araguari, MG, em junho de 2000, utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus, resultou na amplificação de fragmento dos DNA-A e -B com aproximadamente 1.200 e 400 nt, respectivamente (Figura 33). A amplificação foi forte para o DNA-B de joá-de-capote e o DNA-A de feijão, e fraca para o DNA-B de feijão e o DNA-A de joá-de-capote.

Os fragmentos de DNA-A e de DNA-B amplificados a partir de joá-de-capote e de feijoeiro comum foram clonados em pKS+ e parcialmente seqüenciados. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as seqüências dos componentes do TRMV e de outros geminivírus (Quadros 20 e 21). A seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA-A clonado a partir de joá-de-capote apresentou alta homologia ao componente A do TRMV (99,8%), enquanto a seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA-B é apenas 71,3% homóloga ao componente B deste vírus. O oposto ocorre com os fragmentos de DNA clonados a partir de feijoeiro comum. Os fragmentos de DNA-A e DNA-B amplificados a partir deste hospedeiro apresentaram 72,2 e 96,9% de homologia aos componentes A e B do TRMV, respectivamente.

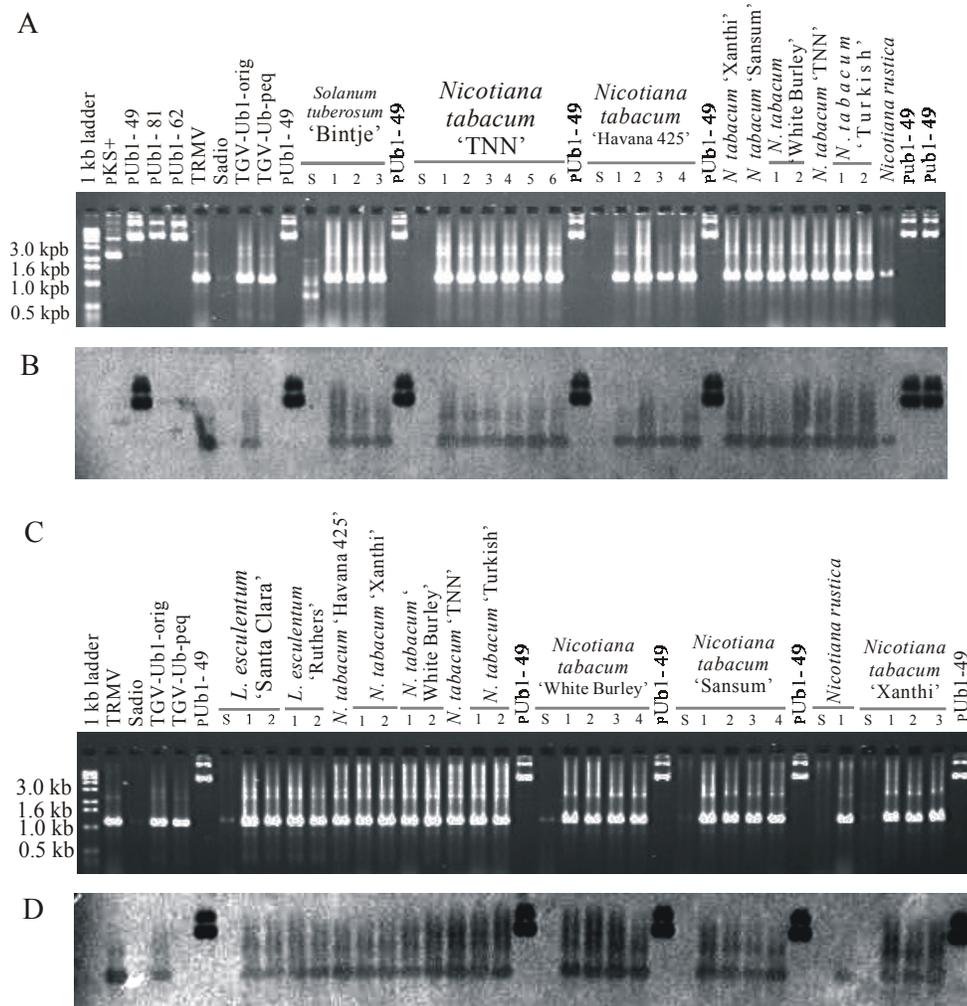


Figura 32 - Detecção do *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV) em plantas inoculadas com o complexo viral TGV-Ub1 por enxertia. (A) e (C), DNA amplificado via PCR com os oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PAR1c496 a partir de plantas inoculadas com TGV-Ub1; pUb1-49, clone RF obtido a partir de TGV-Ub1; (B) e (D), “Southern blot”: Detecção do fragmento de DNA amplificado a partir componente A do TRMV pela sonda RFUb49-total, marcada com digoxigenina e hibridizada a 68°C por 23 h com revelação por 3 h e 40 min.

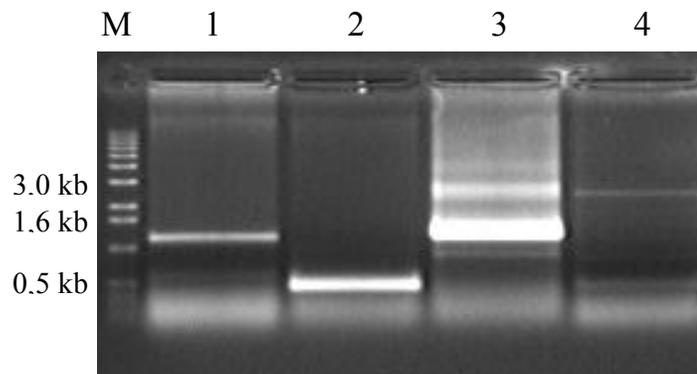


Figura 33 - DNA amplificado via PCR com os oligonucleotídeos universais PAR1c496 e PAL1v1978 (1 e 3) e PCRC1 e PBL1v2040 (2 e 4) a partir de plantas de joá-de-capote (*Physalis floridana*) (1 e 2) e de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) (3 e 4) coletadas em Araguari, MG, em junho de 2000. M, marcador (“1 kb DNA ladder”).

Quadro 20 - Porcentagem de homologia do fragmento do DNA-A amplificado a partir de plantas de joá-de-capote e de feijoeiro comum com o componente A do TRMV e de outros geminivírus

Vírus	Joá-de-capote	Feijoeiro comum
TRMV –A	99,8	72,2
BGMV –A	78,1	-
PYMV –A	-	77,8

TRMV, *Tomato rugose mosaic virus* (clone pUb1-49).

BGMV, *Bean golden mosaic virus*.

PYMV, *Potato yellow mosaic virus*.

(-) não determinado.

Quadro 21 - Porcentagem de homologia do fragmento de DNA-B amplificado a partir de plantas de joá-de-capote e de feijoeiro comum com o componente B do TRMV e de outros geminivírus

Vírus	Joá-de-capote	Feijoeiro comum
TRMV -B	71,3	96,9
TLCV -B	76,7	-
PYMV -B	-	75,6

TRMV, *Tomato rugose mosaic virus* (clone pUb1-81).

TLCV, *Tomato leaf curl virus*.

PYMV, *Potato yellow mosaic virus*.

(-) não determinado.

4. DISCUSSÃO

A purificação biológica é um passo fundamental para a caracterização de espécies e estirpes de vírus. A observação de diferenças na severidade dos sintomas em plantas de ‘Miller Early’ e de *N. benthamiana* inoculadas com o complexo TGV-Ub1, por enxertia e via EVT, respectivamente, e a amplificação de fragmentos DNA de tamanhos diferentes a partir de plantas com severidade de sintomas diferentes foi um forte indicativo de que o complexo TGV-Ub1 era composto de mais de uma espécie ou estirpe de geminivírus. A amplificação de apenas um fragmento de DNA a partir de plantas com sintomas atenuados em relação ao complexo original indicou que havia ocorrido a purificação biológica dos vírus presentes no complexo TGV-Ub1, pois quando os sintomas de infecção viral eram severos sempre se amplificavam dois fragmentos distintos de DNA. Entretanto, não se deve generalizar essas observações, pois a purificação biológica de vírus pode ser obtida e a amplificação de DNA dos isolados puros apresentar no gel bandas com o mesmo tamanho. Neste caso, a indicação da existência de infecção mista será baseada apenas em diferenças sintomatológicas.

Na transmissão viral via EVT, os fatores que podem ter contribuído para a purificação biológica devem estar relacionados a aspectos tais como concentração de partículas virais de cada vírus na amostra ou no EVT, diferença de resistência das partículas virais expostas ao meio ambiente até que sejam

introduzidas no interior de células hospedeiras, e introdução ou não das partículas virais de cada vírus no hospedeiro (MATTHEWS, 1991). Na transmissão viral por enxertia a purificação do complexo pode ter ocorrido porque o ápice caulinar estava naturalmente infectado com apenas um vírus, ou alternativamente, ao se trocar a cultivar hospedeira, um dos vírus presente na amostra pode ter apresentado uma melhor adaptação à planta desta nova cultivar.

A determinação da gama de hospedeiros é fundamental para a identificação das plantas hospedeiras do vírus, podendo indicar potenciais fontes de inóculo no campo e plantas cultivadas que poderão ser infectadas por este patógeno. Os ensaios de gama de hospedeiros utilizando inoculação via EVT demonstraram que a transmissão do complexo TGV-Ub1 por este método é possível, e que o hospedeiro *N. benthamiana* foi o mais adequado para se obter infecção de todas as plantas inoculadas. A transmissão do complexo TGV-Ub1 para tomateiro apresentou uma eficiência muito baixa, tendo sido observada apenas em uma oportunidade onde 20% (2/10) dos tomateiros foram infectados quando a inoculação foi realizada via EVT (dado não apresentado). Estes resultados sugerem a possibilidade de disseminação dos vírus durante as operações de tratos culturais e de colheita. Contudo, o método de inoculação por EVT utilizado para geminivírus é muito drástico e, em tomateiro, a sua eficiência é muito baixa. Além disto, considerando que no campo as condições de inoculação mecânica são menos favoráveis, pela ausência de tampão apropriado e a baixa frequência de inoculação, acredita-se que este mecanismo de disseminação não tenha importância epidemiológica. Ainda por este método de inoculação, o complexo TGV-Ub1 infectou outras nove espécies e variedades do gênero *Nicotiana*. Dentro deste gênero merece destaque o fato que sintomas de infecção viral só foram observados em *N. benthamiana*, *N. glutinosa* e *N. clevelandii*. Nas demais espécies e cultivares, a infecção foi diagnosticada por PCR e, em geral, os índices de infecção foram baixos. *N. glutinosa* e *N. rustica* foram exceções, porque em ambas os índices de infecção foram elevados, 90% e 100%, respectivamente, e porque algumas plantas de *N. glutinosa* e todas as plantas de *N. rustica* permaneceram assintomáticas. A ausência de sintomas na

maioria das espécies e cultivares do gênero *Nicotiana* pode ser explicada pela infecção viral ser causada por apenas um dos vírus que compõem o complexo TGV-Ub1. Em geral, tem sido observado que a infecção mista de geminivírus aumenta a severidade e a complexidade dos sintomas em tomate (UMAHARAN et al., 1998), em mandioca (PITA et al., 2001) e em plantas daninhas (SAUNDERS et al., 2001; UMAHARAN et al., 1998). Outra hipótese é que os sintomas não apareçam em fases iniciais de desenvolvimento da planta, mas sejam perceptíveis em fases finais do seu desenvolvimento, além do período de avaliação utilizado neste trabalho. Os baixos índices de infecção das cultivares de *N. tabacum* podem estar relacionados à possibilidade de os vírus presentes no complexo TGV-Ub1 não serem bem adaptados a estes hospedeiros. Segundo PETTY et al. (2000), geminivírus não adaptados ao hospedeiro podem apresentar redução na replicação do DNA viral. MORRA e PETTY (2000) verificaram que geminivírus não adaptados ao hospedeiro podem não ser capazes de colonizar o mesófilo de folhas infectadas sistemicamente. Segundo estes autores, a infecção pode permanecer assintomática e a quantidade de células infectadas ser menor porque a infecção fica restrita ao sistema vascular, o que diminui a quantidade de DNA viral presente na folha. Estes fatos poderiam dificultar a detecção da infecção por geminivírus e explicar os baixos índices de infecção em *N. tabacum*. Finalmente, é importante salientar que o complexo TGV-Ub1 foi transmitido via EVT para *Nicandra physaloides* (joá-de-capote), uma planta daninha comum em campos de tomateiro e de outras culturas. Este resultado sugere que *N. physaloides* pode ser uma possível fonte de inóculo em condições de campo.

A enxertia de tecidos infectados em plantas saudáveis é um método mais drástico de inoculação do que o EVT, pois após a cicatrização dos tecidos colocados em contato, grande quantidade de inóculo viral é transportada até células saudáveis do hospedeiro inoculado diretamente via floema. Por isso, quando a enxertia apresenta um crescimento satisfatório dos tecidos, os resultados de infecção positiva devem ser considerados com critério. Neste caso a inoculação deve ser realizada utilizando-se outros métodos, por exemplo EVT e biobalística. Entretanto, a inoculação por enxertia não implica necessariamente na quebra da

resistência da planta. GODINEZ-HERNANDEZ et al. (2001) avaliaram plantas de pimenta resistentes ao PHV pela inoculação deste vírus pelos métodos de enxertia e biobalística, e observaram que as plantas evidenciaram a sua resistência, provavelmente ao movimento viral, utilizando-se os dois métodos. Por outro lado, resultados negativos de infecção sistêmica em plantas avaliadas quanto a sintomatologia e via PCR são uma indicação de que o floema da planta não é infectado pelo vírus testado, pois em geral o floema e as células a ele associadas são os principais tecidos infectados pelos geminivírus.

Neste trabalho, a enxertia foi realizada apenas com solanáceas, a fim de aumentar a frequência de sucesso da enxertia e complementar os resultados obtidos com a inoculação via EVT. As sete espécies e cultivares do gênero *Nicotiana* testadas apresentaram sintomas de infecção pelo complexo TGV-Ub1, mas a utilização deste método de inoculação não alterou a gama de hospedeiros do complexo. A observação de sintomas em plantas de *Nicotiana* inoculadas com o complexo TGV-Ub1, no qual a infecção é mista, reforça a hipótese de que as plantas assintomáticas após a inoculação via EVT apresentam infecção por apenas um dos vírus presentes no complexo viral. Contudo, a análise da infecção via PCR não possibilitou a confirmação da presença de dois tamanhos de fragmentos de DNA. Utilizando-se a técnica de enxertia determinou-se que *D. stramonium* e *S. tuberosum* foram infectadas pelo complexo TGV-Ub1. Este resultado sugere que provavelmente estas espécies vegetais pertencem à gama de hospedeiros natural deste complexo viral. Entretanto, estas espécies não foram testadas pela inoculação via EVT e nem por outro método de inoculação devido à falta de plantas adequadas para a inoculação durante o período de realização do teste de gama de hospedeiro. A infecção de *S. tuberosum* sugere que este complexo viral pode infectar outras culturas de elevado valor econômico, e a infecção em *D. stramonium* sugere que esta planta daninha, comum em campos de tomateiro, pode ser uma das fontes de inóculo em condições de campo. A inoculação do complexo TGV-Ub1 por enxertia em plantas de pimentão ‘Casca Dura Ikeda’, pimenta ‘Malagueta’, jiló ‘Verde Claro Comprido’, berinjela ‘Embu’, *P. floridana* e *S. nigrum*, não resultou em infecção sistêmica em

nenhuma das repetições. Não se observou nenhum sintoma de infecção viral, e a análise via PCR não detectou DNA viral nas folhas do ápice de nenhuma das plantas destas espécies. O desenvolvimento do enxerto infectado com o complexo viral foi normal em todas as repetições. Portanto, estes resultados sugerem que estas plantas não são hospedeiras ou são resistentes ao complexo TGV-Ub1, pois a possibilidade de replicação dos vírus presentes no complexo viral nas células das folhas inoculadas não foi avaliada (GODIMEZ-HERNANDEZ et al., 2001; GARRIDO-RAMIREZ et al., 2000).

Recentemente, AMBROZEVIČIUS (2000) estudou o isolado TGV-Ig, obtido de tomateiros cultivados em Igarapé, MG. Segundo esta autora, a gama de hospedeiros do isolado TGV-Ig inclui plantas de pimentão (*C. annuum*), sendo possível a infecção sistêmica desta hospedeira pela inoculação do TGV-Ig via EVT. Esta característica biológica do isolado TGV-Ig é diferente da propriedade do complexo TGV-Ub1. Comparando a gama de hospedeiro do TGV-Ig e os resultados da gama de hospedeiros do TGV-Ub1, percebe-se que os dois infectaram sistemicamente tomateiro ‘Santa Clara’, ‘Miller Early’ e ‘Rutgers’, *D. stramonium*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, e *N. tabacum* ‘Havana 425’, ‘Xanthi’, ‘Sansum’, e ‘TNN’. Uma pequena diferença pode ser observada quanto ao padrão de sintomas: o complexo TGV-Ub1 causa com maior frequência o surgimento de pigmentos amarelados, observação que pode facilitar o diagnóstico da infecção causada por este complexo em condições de campo.

Na cultura do tomate no Brasil, 6 viroses distintas transmitidas por mosca-branca já foram descritas (COSTA et al., 1975). A gama de hospedeiros do complexo TGV-Ub1 testada neste trabalho é similar à gama dos vírus causadores destas 6 viroses nas espécies vegetais *N. glutinosa*, *N. tabacum* ‘TNN’, *L. esculentum*, *D. stramonium* e *P. floridana*. Além disto o TGV-Ub1 possui em comum com estes vírus o fato de ser transmitido por mosca-branca, pois o complexo TGV-Ub1 foi coletado a partir da captura de moscas-brancas vetoras no campo. Em relação ao TGMV, o TGV-Ub1 possui em comum a propriedade de ser transmitido via EVT.

Os métodos de inoculação utilizados neste trabalho são importantes experimentalmente, mas em condições de campo não devem contribuir significativamente para a disseminação do TGV-Ub1. A inoculação das plantas da gama de hospedeiros também poderia ter sido realizada via biobalística. Neste método, o DNA viral é colocado diretamente nas células do floema, resultando em alta eficiência de inoculação. Entretanto, este também não é um método de disseminação natural de vírus de plantas. A gama de hospedeiro do TGV-Ig foi ampliada, talvez de forma artificial, utilizando-se este método de inoculação (AMBROZEVIČIUS, 2000).

No trabalho com o complexo TGV-Ub1, a infectividade de clones de geminivírus foi determinada utilizando-se a biobalística. A inoculação também poderia ter sido realizada utilizando-se o vetor natural do complexo TGV-Ub1, a mosca-branca (*B. tabaci*) (FERNANDES et al., 1997). Do ponto de vista epidemiológico e da disseminação do vírus nas condições de campo, este seria o método recomendado para determinar a gama de hospedeiros de qualquer isolado de begomovírus. Este tipo de transmissão provavelmente representaria a gama de hospedeiros natural do TGV-Ub1. Contudo, durante a manutenção destes insetos em ambientes isolados pode ocorrer o escape de adultos de mosca-branca para o meio exterior, razão pela qual elas não foram utilizadas neste estudo.

Apesar dessas ressalvas, os dois métodos de inoculação testados neste trabalho apresentaram resultados consistentes, pois somente plantas de *Solanaceae* foram infectadas sistemicamente. Esses resultados sugerem que a gama de hospedeiros natural do complexo TGV-Ub1 está restrita a essa família.

A clonagem da forma replicativa de geminivírus baseada no método de GILBERTSON et al. (1991) foi adequada para a obtenção de clones com inserto de DNA de aproximadamente 2.600 nt a partir de DNA extraído de plantas de tomate infectadas com o complexo TGV-Ub1. A maior dificuldade desta estratégia foi a obtenção de preparações com quantidade de DNA detectável em gel de agarose, pois a visualização de bandas no gel foi fundamental para a estimativa das quantidades de DNA a utilizar na reação de ligação entre a RF do geminivírus e o vetor pKS+, ambos linearizados.

A comparação de seqüências de nucleotídeos de clones selecionados ao acaso, para os diferentes sítios de clonagem utilizados, com seqüências depositadas no GenBank, indicou que 9 dos 11 clones seqüenciados possuíam homologia significativa a geminivírus, mas também existiam clones homólogos a DNA de origem vegetal. Entre clones da RF de geminivírus, também ficou evidente a existência de clones com homologia significativa ao componente A ou ao componente B de begomovírus.

A análise comparativa das seqüências completas dos componentes virais clonados em pUb1-49, pUb1-62 e pUb1-81 com as seqüências de outros geminivírus revelaram que os componentes virais possuem identidade significativa e características moleculares típicas de geminivírus, com organização genômica típica dos componentes de begomovírus, porém não alcançando 90% de homologia de seqüência com nenhum begomovírus previamente caracterizado. Entre os membros desse gênero, identidade de seqüência superior a 90% constitui critério de classificação dos vírus como estirpes, enquanto a identidade de seqüência entre componentes virais inferior a 90% é suficiente para classificação em espécies (RYBICKI, 1994; PADIDAM et al., 1995; VAN REGENMORTEL et al., 2000). Baseado nesse critério taxonômico, os clones pUb1-49, pUb1-62, e pUb1-81 podem ser considerados componentes de novos begomovírus ainda não caracterizados. Os clones pUb1-49 e pUb1-81, por possuírem região comum com homologia altamente significativa, constituem o genoma de um novo begomovírus, denominado *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). Esses clones foram infecciosos em *L. esculentum* e *N. benthamiana*. O clone pUb1-62 possui a RC distinta do TRMV e de outros begomovírus. Considerando-se este critério, a baixa identidade de seqüência de nucleotídeos e a não formação de pseudo-recombinante com o TRMV, pode-se dizer que este componente B também deve pertencer a uma nova espécie de begomovírus ainda não descrita, e que ele deve possuir um componente A cognato ainda não identificado.

Nas árvores filogenéticas das seqüências de nucleotídeos de geminivírus, o TRMV e o componente viral clonado em pUb1-62 ocupam uma posição entre

os begomovírus do hemisfério ocidental. A distribuição de identidade da seqüência de aminoácidos da proteína capsidial (AV1) e da proteína de movimento (BC1) foi similar àquela observada para a seqüência completa de nucleotídeos dos componentes virais. Assim, também, a filogenia das proteínas AC1, AC2, AC3 e BV1 (dados não apresentados) classificou o novo geminivírus e o componente viral clonado em pUb1-62 como espécies distintas do gênero *Begomovirus* do hemisfério ocidental. Além disto, as análises filogenéticas das seqüências completas de nucleotídeos e dos aminoácidos das ORFs preditas para os genomas do TRMV-A, TRMV-B e do RFUb1-62 sugerem que estes vírus se originaram aproximadamente na mesma época que surgiram o TGMV e o BGMV-BR. Portanto, estas análises são consistentes com a hipótese de que os vírus clonados do complexo TGV-Ub1 estavam em plantas silvestres ou cultivadas e foram transferidos para o tomateiro pelo biótipo B de *B. tabaci* introduzido recentemente no Brasil.

As hibridizações realizadas com as sondas TGV-BZ-A-*EcoRI* e pTG1.4B (Quadro 1) a 58°C objetivaram determinar dentre os 87 clones obtidos neste trabalho aqueles que possuem insertos de DNA com homologia significativa a geminivírus. Os resultados apresentados no Quadro 15 mostram que 55 clones hibridizaram com pelo menos uma destas sondas, mas deve-se salientar que 22 clones não foram testados com a sonda TGV-BZ-A-*EcoRI*. Entretanto, a identidade dos 55 clones deve ser confirmada utilizando-se outras sondas, pois o clone pUb1-50 hibridizou com a sonda TGV-BZ-A-*EcoRI* mas este DNA não pertence a geminivírus: a sua seqüência de nucleotídeos tem homologia significativa com DNA mitocondrial. Outro aspecto a ser considerado é que alguns clones hibridizaram com as duas sondas. Estes fatos estão em acordo com a expectativa de que as hibridizações apresentavam baixa especificidade, suficiente apenas para distinguir DNA de geminivírus de DNA do tomateiro, na maioria dos casos.

As hibridizações realizadas com as sondas Ub62(*NcoI-HindIII*) e Ub49(A1-496) a 68°C objetivaram identificar dentre os 87 clones aqueles que possuem identidade igual aos clones pUb1-62 e pUb1-49, respectivamente, pois

nestas condições de hibridização estas sondas foram específicas, discriminando entre os genomas testados (Figuras 30 e 31). Por exemplo, nas condições de hibridização e detecção utilizadas neste trabalho, a sonda Ub62 (*NcoI-HindIII*) detectou o clone pUb1-62 mas não detectou pUb1-81. A sonda Ub49 (A1-496) detectou o componente A do TRMV mas não detectou o DNA do isolado TGV-Ub1-peq. Portanto, pode-se afirmar que 16 clones possuem alta homologia a pUb1-62, enquanto que, por exclusão, 5 clones devem possuir alta homologia com o pUb1-81, partindo-se do princípio que apenas dois geminivírus estavam presentes no complexo TGV-Ub1. A hibridização com a sonda Ub49 (A1-496) indicou que 29 dos clones obtidos apresentam alta homologia ao clone pUb1-49, e que dois destes, pUb1-01 e pUb1-55 apresentaram, para bandas de mesma intensidade no gel de agarose, um menor nível de detecção por esta sonda, num mesmo ensaio e condições de hibridização.

Além destes aspectos, observa-se que os clones pUb1-25 a -48 e pUb1-60 e -69 não hibridizaram com nenhuma das duas sondas para o componente B, nem com a sonda Ub49 (A1-496), específica para o componente A do TRMV. É importante salientar que estes 22 clones não foram testados quanto à hibridização em condições de baixa especificidade com uma sonda para o componente A. Por exemplo, o clone pUb1-70 não foi detectado por nenhuma das duas sondas para o componente B, porém foi detectado pela sonda TGV-BZ-A-*EcoRI* em condições de baixa especificidade e pela sonda Ub49 (A1-496) em condições de alta especificidade, o que indica que ele possui alta homologia de seqüência com o clone pUb1-49. Estes resultados sugerem a possibilidade de que os clones pUB1-25 a -48 e pUb1-60 e -69 podem conter inserto de DNA de geminivírus.

O teste de infectividade do clone pUb1-G1 (1,8 cópia de pUb1-49) combinado com os clones pUb1-G4 (1,8 cópia de pUb1-81) ou pUb1-G7 (1,5 cópia de pUb1-62) em *N. benthamiana* e em *L. esculentum* ‘Santa Clara’ demonstrou que os clones pUb1-G1 e pUb1-G4 foram capazes de produzir infecção sistêmica nos dois hospedeiros após inoculação via biobalística. Os clones pUb1-G1 e pUb1-G7 não causaram infecção sistêmica em nenhum dos

hospedeiros testados, mas a análise via PCR indicou infecção no local de bombardeamento do DNA em tomateiro ‘Santa Clara’. Assim, a infecção sistêmica causada pelos clones pUb1-G1 e pUb1-G4 (TRMV) em 29,2% e 25% das plantas de *N. benthamiana* e de tomateiro ‘Santa Clara’, respectivamente, demonstra que estes clones são infecciosos. Os sintomas causados nos dois hospedeiros foram menos severos do que os causados pelo complexo TGV-Ub1. Os sintomas causados pelo TRMV em tomateiro ‘Santa Clara’ foram semelhantes aos sintomas causados pela infecção dos isolados puros TGV-Ub1-Enx-11 e -Enx-13 em tomateiro ‘Miller Early’ e do isolado puro TGV-Ub1-peq em ‘Santa Clara’.

Esses resultados são consistentes com a classificação do TRMV como um begomovírus com dois componentes genômicos, e indicam que o componente B clonado em pUb1-62 necessita de um componente A cognato para infecção e desenvolvimento de sintomas sistêmicos. Os resultados demonstram também que o componente B de pUb1-62 não forma pseudo-recombinante com o componente A do TRMV. A não formação de pseudo-recombinante e o fato de a sintomatologia causada pela infecção de tomateiro e de *N. benthamiana* pelo TRMV apresentar sintomas de menor severidade sugerem que para a ocorrência dos sintomas severos causados pelo complexo TGV-Ub1 nestes dois hospedeiros seja necessário que pelo menos dois vírus estejam infectando a mesma planta hospedeira. Estes resultados concordam com as observações de amplificação de dois fragmentos de DNA de diferentes tamanhos a partir do complexo TGV-Ub1 e asseguram que este complexo viral causa infecção mista de geminivírus em tomateiro.

A recombinação e a pseudo-recombinação é possibilitada pela ocorrência de infecções mistas (LAZAROWITZ, 1991; HARRISON et al., 1997; HARRISON e ROBINSON, 1999; ROYE et al., 1999). O aumento da severidade e da complexidade dos sintomas devido a infecções mistas e pelo surgimento de recombinantes foram observadas em tomateiro (UMAHARAN et al., 1998; TORRES-PACHECO et al., 1996) e em mandioca (PITA et al., 2001). Assim, considerando os resultados deste trabalho, é razoável supor que em condições de

campo poderá ocorrer o surgimento de uma nova espécie ou estirpe de begomovírus, mais adaptada ao tomateiro e aumentando a severidade dos sintomas ou danos ao tomateiro, a partir de eventos de recombinação entre os geminivírus presentes no complexo TGV-Ub1 ou com outros isolados de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro (Capítulo 2). Esta nova espécie ou estirpe poderá aumentar a severidade desta virose em tomateiro, como foi observado em tomateiro em Trinidad e Tobago (UMAHARAN et al., 1998) e em mandioca em Uganda (PITA et al., 2001).

Os ensaios de transmissão do TRMV via EVT demonstraram que este vírus pode ser transmitido por este método de inoculação. Os sintomas de infecção foram discretos, apresentando poucas alterações em relação às plantas saudáveis utilizadas como controle, e para a maior parte das plantas infectadas a infecção só foi detectada pela análise via PCR. O complexo TGV-Ub1 foi transmitido para 100% das plantas testadas, fato comum na maioria das inoculações realizadas com este complexo durante a condução deste trabalho, enquanto o TRMV foi transmitido para no máximo 40% das plantas testadas, podendo significar que quando a infecção é simples a eficiência da transmissão é menor, talvez pelo fato da concentração de partículas virais na planta infectada ser mais baixa.

A inoculação por enxertia de *S. tuberosum* com o TRMV demonstrou que este vírus pode infectar esta hospedeira, concordando com a infecção desta hospedeira pelos dois vírus que compõem o complexo TGV-Ub1 (item 3.2.1.2). Da mesma forma que a infecção pelo TRMV em tomateiro e em *N. benthamiana*, os sintomas causados pelo TRMV em *S. tuberosum* foram menos severos do que os observados quando a infecção era causada pelo complexo TGV-Ub1. O mesmo comportamento foi observado para a infecção de *D. stramonium* pelo TRMV e pelo complexo TGV-Ub1. Estes resultados sugerem que o TRMV tem potencial para infectar plantas do *S. tuberosum* e *D. stramonium* em condições de campo.

A provável gama de hospedeiros do TRMV foi determinada indiretamente pela hibridização da sonda RFUb49-total a 68°C com fragmentos

de DNA amplificados de plantas infectadas com o TGV-Ub1 durante os ensaios de gama de hospedeiro deste complexo viral (item 3.2.1). O TRMV foi detectado em todas as 41 plantas infectadas com TGV-Ub1 por meio de enxertia, a maioria cultivares de *N. tabacum*, indicando que o TRMV pode infectar esta espécie vegetal. O TRMV também foi detectado em todas as espécies e cultivares de plantas infectadas com o TGV-Ub1 quando inoculado via EVT, mas não em todas as repetições das espécies *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, e *N. glutinosa*. Este fato é interessante porque estas repetições negativas para a presença do TRMV (com base na observação de sintomas) apresentavam infecção por geminivírus quando analisadas via PCR. A não hibridização com a sonda RFUb49-total a 68°C sugere que elas poderiam ter uma infecção simples por TGV-Ub1-peq, outro geminivírus presente no complexo TGV-Ub1 e purificado biologicamente durante este trabalho. Nestas condições de hibridização, a sonda RFUb49-total foi específica para o componente A do TRMV (Figura 29).

Os resultados obtidos sugerem que o TRMV possui a mesma gama de hospedeiros que o complexo TGV-Ub1, mas deve-se mencionar que, por falta de amostras, não se examinou nestes ensaios a possibilidade do TRMV infectar *Nicandra physaloides*.

A análise via PCR de plantas de joá-de-capote (*N. physaloides*) e de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) coletadas próximas a lavouras de tomate no Triângulo Mineiro indicou que estas plantas poderiam estar infectadas por geminivírus. A comparação das seqüências de nucleotídeos dos clones de fragmentos de DNA-A e de DNA-B obtidos a partir destas plantas confirmou a presença de geminivírus, e sugeria a existência de espécies do gênero *Begomovirus*. Os resultados demonstraram que o fragmento de DNA-A clonado de joá-de-capote e de DNA-B clonado de feijoeiro comum apresentam índices de homologia significativa, acima de 96%, com os componentes A e B do TRMV, respectivamente, sugerindo que o TRMV ou uma estirpe deste vírus pode infectar estes hospedeiros em condições de campo. Durante os trabalhos de gama de hospedeiros aqui conduzidos não se obtiveram feijoeiros infectadas pelo complexo TGV-Ub1. Estes resultados sugerem que o feijoeiro comum pode

pertencer à gama de hospedeiros do TRMV quando a disseminação do vírus é realizada pela mosca-branca vetora, possibilidade consistente com a observação da infecção do feijoeiro ‘Emgopa Ouro 201’ pelo complexo TGV-Ub1 durante a sua coleta, quando este complexo foi inoculado em feijoeiro por moscas-brancas (REZENDE et al., 1996). Os resultados aqui apresentados também sugerem que os componentes genômicos do TRMV ocorrem em infecção mista com outro geminivírus ou são replicados por outros componentes genômicos não identificados. Como uma das hospedeiras nas quais se identificou um dos componentes do TRMV pertence a *Solanaceae*, é possível que estes outros geminivírus também possam infectar o tomateiro ou outras solanáceas cultivadas. Além disto, os resultados reforçam a idéia de que os geminivírus que estão ocorrendo em tomateiro no Brasil estavam presentes na vegetação nativa e foram introduzidos, disseminados e mantidos em culturas de tomateiro devido à ocorrência do biótipo B de *B. tabaci* (LOURENÇÃO e NAGAI, 1994; FRANÇA et al., 1996; HAJI et al., 1996; RIBEIRO et al., 1998). Isolados de geminivírus que infectam o tomateiro, outras culturas e plantas daninhas também foram detectados em Trinidad e Tobago (UMUAHARAN et al., 1998) e no México e EUA (TORRES-PACHECO et al., 1996), concordando com as observações aqui registradas. Em conjunto, estes resultados sugerem que plantas silvestres e outras plantas cultivadas podem ser fonte de inóculo primário para ocorrência de epidemias de geminivírus na cultura do tomate, principalmente quando existe a presença do inseto vetor.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GEMINIVÍRUS ASSOCIADOS AO TOMATEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, geminivírus em tomateiro foram estudados pela primeira vez em 1975, no Estado de São Paulo (MATYIS et al., 1975), mas sempre foram considerados de reduzida importância econômica devido à sua baixa incidência nesse hospedeiro. Entretanto, nos últimos anos, a ocorrência de geminivírus causando danos econômicos em tomateiros foi relatada em diversos Estados brasileiros (RIBEIRO et al., 1994; REZENDE et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; ZERBINI et al., 1996; FARIA et al., 1997; BEZERRA et al., 1997; BEZERRA et al., 1998; SANTOS et al., 1998).

Em Minas Gerais, além das duas novas espécies de geminivírus descritas em tomateiro, o *Tomato chlorotic mosaic virus* (TCMV) (AMBROZEVICIUS, 2000) e o *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV) (Capítulo 1), a caracterização parcial de outros isolados virais indicou a existência de pelo menos duas outras novas espécies (AMBROZEVICIUS, 2000; Capítulo 1). A existência de um alto

grau de diversidade genética de geminivírus em tomateiro no Brasil já havia sido sugerida em 1975 por COSTA et al., que relataram a existência de seis vírus distintos transmitidos por *Bemisia tabaci* a este hospedeiro. Recentemente, RIBEIRO et al. (2002) analisando filogeneticamente as seqüências de nucleotídeos de fragmentos de DNA de geminivírus que infectam o tomateiro no Brasil, concluíram que existem pelo menos cinco espécies de begomovírus infectando este hospedeiro no país. Segundo estes autores, dois destes geminivírus são encontrados exclusivamente no Nordeste, dois são encontrados exclusivamente em Estados da região Sudeste e um foi encontrado em ambas as regiões. Situação oposta foi observada em relação à diversidade de BGMV-Br em feijoeiro no Brasil. FARIA e MAXWELL (1999) analisaram seqüências de geminivírus clonadas a partir de amostras de feijoeiro com sintomas típicos de mosaico dourado coletadas nas principais regiões brasileiras de produção de feijão e concluíram que as amostras continham geminivírus com seqüência altamente semelhantes à do BGMV-Br, indicando a existência de um baixo grau de diversidade genética entre os isolados desse vírus no Brasil.

No continente americano, até o início da década de 80, begomovírus causavam danos econômicos principalmente na produção de leguminosas, enquanto apenas casos isolados e não significativos eram relatados em lavouras de tomate. Atualmente, regiões produtoras de tomate no Brasil, Venezuela, em diversos países da América Central e do Caribe, México e Estados Unidos têm sofrido os efeitos de uma alta incidência de begomovírus, acarretando grandes perdas na produção (POLSTON e ANDERSON, 1997).

Dentre os geminivírus transmitidos para o tomateiro por cigarrinhas, encontram-se o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) (BRIDDON et al., 1996) e o *Beet curly top virus* (BCTV) (STANLEY et al., 1986). Os geminivírus transmitidos por mosca-branca incluem o TGMV, TYLCV, *Tomato mottle virus* (ToMoV), *Tomato yellow dwarf virus* (TYDV), *Tomato yellow mosaic virus* (TYMV), *Tomato leaf crumple virus* (TLCrV), *Pepper huasteco virus* (PHV) e *Chino del tomate virus* (CdTV) (POUR et al., 1991; ABOUZID et al., 1992; PAPLOMATAS et al., 1994). Muitos desses vírus estão restritos a certas regiões,

como o ToMoV na Flórida, EUA, e o TYMV na Venezuela. No México, entretanto, diversos geminivírus podem ser encontrados em tomateiro, inclusive em infecções mistas. A ocorrência de infecções mistas favorece a evolução dos geminivírus, facilitando a ocorrência de recombinação e pseudo-recombinação entre os diferentes componentes genômicos.

Além das diversas espécies de geminivírus que infectam o tomateiro, uma outra fonte de variação seriam os geminivírus que infectam plantas daninhas e silvestres, que podem ser transferidos para o tomateiro por meio do biótipo B de *B. tabaci*. Um exemplo de um reservatório natural de geminivírus é *Sida rhombifolia*, a partir da qual plantas agronomicamente importantes seriam infectadas. De fato, a caracterização biológica do *Sida golden mosaic virus* da Costa Rica (SiGMV-Co) revelou que este vírus é capaz de infectar o tomateiro e o feijoeiro. Vários relatos podem ser encontrados na bibliografia associando infecções de geminivírus à presença de plantas daninhas nas lavouras (CREAMER et al., 1996; ROYE et al., 1997; UMAHARAN et al., 1998; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 1999).

O conhecimento da diversidade genética de um vírus ocorrendo em uma determinada área é importante para definir estratégias de controle corretas a serem adotadas. Por exemplo, o TYLCV-Sr ocorria no sudoeste da Espanha desde 1992 causando epidemias severas em culturas de tomate (MORIONES et al., 1993). O TYLCV-Is foi relatado nesta área em 1997 (NAVAS-CASTILHO et al., 1997). Embora causem sintomas praticamente iguais em tomateiro, TYLCV-Sr e TYLCV-Is constituem na realidade duas espécies distintas do gênero *Begomovirus*: os isolados de TYLCV-Sr e TYLCV-Is caracterizados na Espanha apresentam 78% de homologia de seqüência para o DNA-A (SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 1999). Estudando a epidemia destes vírus em tomates desta região, estes autores observaram um rápido deslocamento do TYLCV-Sr deste nicho ecológico e a predominância do TYLCV-Is em lavouras de tomate da região de Málaga, no sudoeste da Espanha. Considerando que o desenvolvimento de cultivares resistentes é a melhor opção para o controle desta virose e que existem diferenças no comportamento de linhagens de tomate

melhorado em relação às diferentes espécies de TYLCV (FARGETTE et al., 1996), percebe-se a importância da caracterização da diversidade genética para o controle da virose.

A diversidade genética em vírus pode ser gerada por mutação, recombinação, rearranjo de componentes genômicos (pseudo-recombinação) ou aquisição (transferência horizontal) de genes. A recombinação pode conferir vantagens seletivas na evolução de espécies, gêneros ou famílias de vírus (HOLLAND, 1998). A recombinação é um dos mecanismos de ocorrência mais frequente em geminivírus. Analisando seqüências completas de nucleotídeos de 64 geminivírus, PADIDAM et al. (1999) obtiveram evidências que a recombinação interespecífica resultou em um alto grau de diversidade genética entre geminivírus. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos do PHV indica que esse vírus é o resultado de recombinação entre geminivírus do “Velho Mundo” (ACMV) e do “Novo Mundo” (ToMoV) (TORRES-PACHECO et al., 1993).

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita um mecanismo alternativo para obtenção de variabilidade genética, o rearranjo de componentes entre vírus distintos (pseudo-recombinação). Estes pseudo-recombinantes podem ser obtidos artificialmente *in vivo* utilizando-se clones dos componentes A e B, conforme obtido por GILBERTSON et al. (1993) para o ToMoV e o BDMV, ou podem ocorrer naturalmente no campo, conforme verificado por PAPLOMATAS et al. (1994) em plantas de tomate infectadas pelo TLCrV.

Experimentos com pseudo-recombinantes são também ferramentas importantes no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes genômicos do BGMV-PR/DR e BGMV-BR, que possuem homologia de seqüência de nucleotídeos inferior a 75% e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (GILBERTSON et al., 1993). Geminivírus com regiões comuns (RC) suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas frequentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na replicação e infecção sistêmica, como no caso da pseudo-recombinação entre o DNA-A do

BGMV-PR/DR e DNA-B do BGMV-PR/GA (Faria et al., 1994, citados por FARIA e ZERBINI, 2000).

Evidências diretas do papel da recombinação e pseudo-recombinação na evolução de geminivírus e sua adaptação a novos hospedeiros foram obtidas por HOU e GILBERTSON (1996) utilizando um pseudo-recombinante formado pelo DNA-A do ToMoV e DNA-B do BDMV. Esse pseudo-recombinante, embora infeccioso, apresentava acúmulo reduzido do DNA-B em relação ao DNA-A, e induzia sintomas atenuados em *N. benthamiana*. Entretanto, após três passagens via extrato foliar tamponado nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das RC's dos DNAs -A e -B do pseudo-recombinante provou a ocorrência de recombinação intermolecular na RC do DNA-B do BDMV, tornando-a a mesma da RC do DNA-A do ToMoV e permitindo que o DNA-B fosse reconhecido com 100% de eficiência pela proteína REP do ToMoV.

Analisando a seqüência parcial de nucleotídeos do componente A de isolados de begomovírus de feijoeiro, FARIA e MAXWELL (1999) verificaram a existência de um baixo grau de diversidade genética entre os fragmentos de DNA amplificados a partir de geminivírus presentes em plantas com sintomas típicos de mosaico dourado coletadas nas principais regiões produtoras de feijão, localizadas em sete Estados brasileiros, indicando que o BGMV destas regiões pode ser considerado uma única população. Entretanto, várias estirpes do BGYMV (*Bean golden yellow mosaic virus*, anteriormente denominado BGMV Tipo II) foram bem caracterizadas (ex. BGYMV-GA, -DR, -PR, e -MX), com diferenças na seqüência de nucleotídeos, sintomatologia e formação de pseudo-recombinantes infecciosos (FARIA et al., 1994; GILBERTSON et al., 1991b; GARRIDO-RAMIREZ et al., 2000). Em contraste, isolados da mesma estirpe do BGYMV possuem um alto grau de identidade de seqüência (> 95%) na região mais variável do componente B, propriedades biológicas similares, e freqüentemente ocorrem na mesma região geográfica (FARIA e MAXWELL, 1999, GILBERTSON et al., 1991b; GARRIDO-RAMIREZ et al., 2000).

Entre geminivírus que infectam o tomateiro e outras culturas, a situação é distinta. A detecção de begomovírus em amostras de tomate, pimentão e outras hortaliças coletadas no México e nos Estados Unidos revelou a ocorrência de várias espécies distintas infectando estas culturas (TORRES-PACHECO et al., 1996). Analisando a seqüência de nucleotídeos de isolados que apresentavam diferenças de sintomatologia em uma mesma espécie hospedeira ou que infectavam plantas de espécies diferentes, os autores detectaram a ocorrência de diferentes espécies e estirpes de begomovírus infectando tomate e pimentão, alguns com distribuição generalizada na área amostrada e outros restritos a determinadas regiões geográficas. Segundo os autores, as plantas de tomate apresentavam infecção por diferentes vírus, com a ocorrência de infecções simples e mistas.

Estudando a identidade, a diversidade e a gama de hospedeiros de geminivírus em sete culturas e oito espécies de plantas daninhas de 12 localidades agrícolas de Trinidad e Tobago, UMAHARAN et al. (1998) verificaram que a ocorrência de infecções mistas de begomovírus era comum, com oito dentre nove espécies de plantas mostrando evidências de infecção mista. Estes autores verificaram que a incidência de mais de um begomovírus causando sintomas complexos em plantas cultivadas era freqüente, sendo mais a regra do que a exceção. Os resultados demonstraram que os begomovírus possuem uma ampla gama de hospedeiros, podendo infectar um número variado de plantas cultivadas, tais como tomate, pimenta, quiabo e feijão durante as estações de cultivo, e sobrevivendo em plantas daninhas durante os períodos de entressafras. O seqüenciamento de clones infecciosos indicou a existência de begomovírus originados pela recombinação entre diferentes espécies.

A diversidade genética de geminivírus associados a plantas daninhas na Jamaica foi estudada utilizando-se sondas gerais e específicas, PCR com oligonucleotídeos universais e seqüenciamento (ROYE et al., 1997). Estes autores detectaram begomovírus em *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides* e *Wissadula amplissima*. Os begomovírus encontrados em *Sida* spp. e *Macroptilium lathyroides* apresentaram seqüências de nucleotídeos da região

comum quase idênticas entre si e foram designados *Sida golden mosaic virus*, isolado da Jamaica (SiGMV-JA). O begomovírus detectado em *Wissadula amplíssima* apresentou seqüência da região comum suficientemente diferente para ser designado como uma nova espécie, denominada *Wissadula golden mosaic virus* (WGMV). A análise de begomovírus em plantas com sintoma de mosaico dourado indicou que as amostras de *M. lathyroides* estavam infectadas por um ou mais vírus. Em uma das amostras a infecção mista foi detectada pela amplificação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Os resultados também indicaram que o SiGMV-JA e o WGMV são amplamente distribuídos na ilha da Jamaica. As seqüências de nucleotídeos da região comum e de aminoácidos das proteínas REP, CP, NS e MP de vários isolados de SiGMV-JA e de WGMV de diferentes localidades da Jamaica foram comparadas entre si e com as seqüências respectivas de outros geminivírus. Os resultados indicaram que diferentes geminivírus infectam estas plantas daninhas em diferentes regiões do Caribe e da América Central, e que nenhum dos geminivírus infectando plantas daninhas foi detectado em plantas cultivadas.

Vários estudos recentes suportam a hipótese de que os begomovírus transmitidos por mosca-branca evoluíram ao longo de três ramos de diferentes origens geográficas, num padrão semelhante à variação genética da mosca-branca (HONG e HARRISON, 1995; CZOSNEK e LATERROT, 1997; ZHOU et al., 1996; PAXIMADIS et al., 1999). A análise filogenética da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial divide estes vírus em três grupos: (a) Américas, (b) Ásia/Austrália, e (c) África/Mediterrâneo/Oriente Médio. Segundo POWER (2000), é interessante que nenhuma relação foi detectada entre eles com base em plantas hospedeiras em comum. Por exemplo, um begomovírus infectando fumo na região do Novo Mundo é muito mais similar a outros begomovírus do Novo Mundo do que a begomovírus infectando fumo no Zimbábue (PAXIMADIS et al., 1999). POWER (2000) sugere que esta variação genética associada à determinada região geográfica parece refletir o isolamento espacial dos três grupos de geminivírus em combinação com sua adaptação a uma diversidade de plantas. Entretanto, esta variação genética pode refletir a

distribuição geográfica da pressão de seleção exercida pela mosca-branca vetora: um determinado begomovírus é transmitido com mais eficiência por um biótipo de mosca-branca da mesma região geográfica do que por biótipos de regiões diferentes (MCGRATH e HARRISON, 1995). Além disso, em levantamentos de incidência de estirpes de TYLCV na Espanha, a substituição de uma estirpe por outra parece ter sido direcionada pela alta eficiência de transmissão da estirpe que passou a predominar pelos biótipos locais de mosca-branca (SANCHEZ-CAMPOS et al., 1999). Considerando estes exemplos, POWER (2000) conclui que a variabilidade genética dos begomovírus é influenciada pelas exigências para manutenção da sua transmissão pela mosca-branca.

Considerando-se a grande diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro em todo o mundo e as implicações dessa diversidade em programas de melhoramento visando à produção de cultivares resistentes, a segunda parte deste trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras

Amostras foliares de plantas com sintomas semelhantes aos de infecção por geminivírus, incluindo mosaico amarelo ou dourado e deformações foliares, foram coletadas em dezoito lavouras de tomate localizadas nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia, na região do Triângulo Mineiro (Figura 34, Quadro 22), em junho de 2000. Cada amostra constituiu de duas ou três folhas de uma única planta, as quais foram acondicionadas individualmente, identificadas, resfriadas até aproximadamente 4°C e transportada para o Lab. de Virologia Vegetal Molecular do DFP/UFV, em Viçosa, MG. Também foram coletadas algumas amostras de diferentes espécies de plantas daninhas apresentando sintomas de infecção viral semelhantes aos de infecção por geminivírus, presentes nas proximidades de lavouras de tomate. Na UFV, as amostras foram armazenadas em ultracongelador (-80°C).

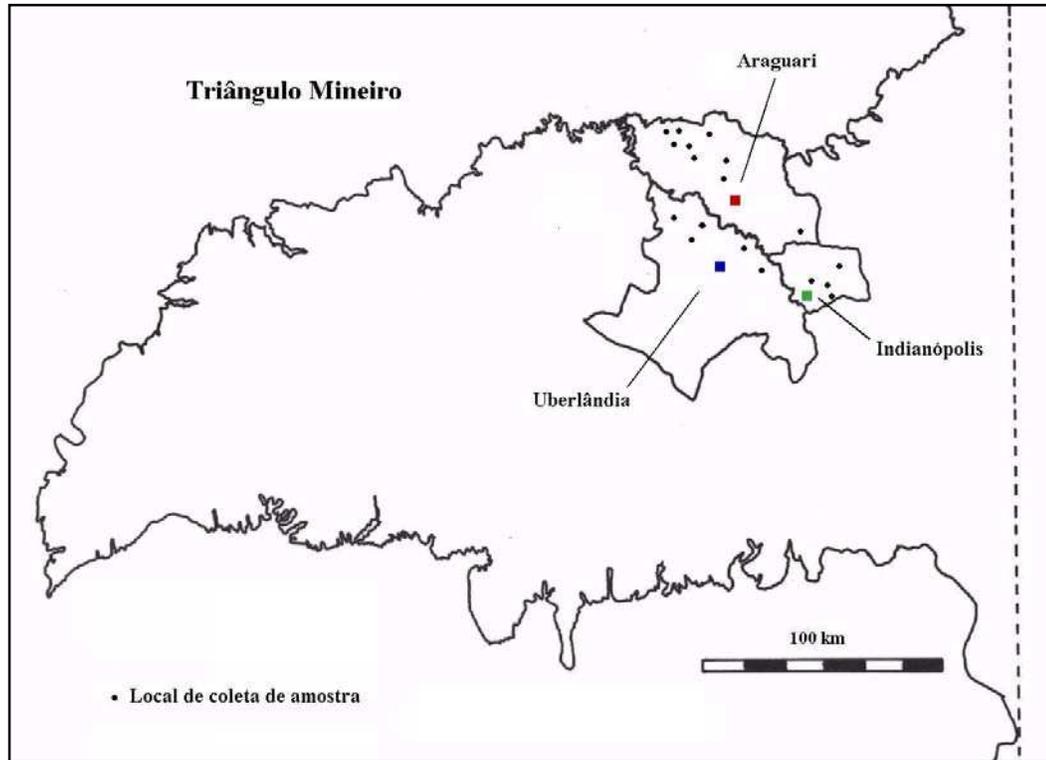


Figura 34 - Localização aproximada das propriedades onde foram coletadas amostras foliares de tomateiro, em junho de 2000, na região do Triângulo Mineiro.

2.2. Extração do DNA viral e PCR

O DNA viral de cada uma das amostras foi extraído segundo o método de DELLAPORTA et al. (1983) e submetido à amplificação por PCR, conforme descrito no item 2.1 (Capítulo 1). A infecção por geminivírus foi confirmada pela amplificação de um fragmento do DNA-A, conforme descrito no item 2.1 (Capítulo 1).

Quadro 22 - Relação de amostras coletadas em junho de 2000 nos principais municípios produtores de tomate na região do Triângulo Mineiro

Propriedade	Município	Amostras		
		Tomateiro Nº	Outras espécies	
			Nº	Gênero/Espécie
A	Uberlândia	9	-	-
B	Uberlândia	3	-	-
C	Uberlândia	15	-	-
D	Araguari	7	2	<i>Malva</i> sp., <i>Sida</i> sp.
E	Araguari	6	4	<i>Sida</i> sp., <i>Nicandra physaloides</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
F	Araguari	4	-	-
G	Araguari	5	1	<i>Sida</i> sp.
H	Araguari	3	-	-
I	Araguari	10	-	-
J	Araguari	11	1	<i>Sida</i> sp.
L	Araguari	1	1	<i>Sida</i> sp.
M	Indianópolis	13	1	<i>Sida</i> sp.
N	Indianópolis	15	2	<i>Sida</i> sp.
O	Indianópolis	7	-	-
P	Indianópolis	15	-	-
Q	Araguari	15	-	-
R	Uberlândia	16	-	-
S	Uberlândia	15	2	<i>Sida</i> sp., <i>Solanum nigrum</i>

(-) não houve coleta.

2.3. Análise de “Southern blot”

O produto da amplificação do DNA viral foi hibridizado, utilizando tampão padrão, com as sondas Ub49(A1-496) e RFUb49-total (Quadro 1, Capítulo 1), preparadas com o kit “DIG DNA Labelling and Detection” (Boehringer Mannheim), conforme recomendações do fabricante, com o objetivo de verificar a homologia da seqüência de nucleotídeos dos vírus presentes nas amostras coletadas com a seqüência do componente A do TRMV. Foram realizadas hibridizações a 68°C por 19 horas e a 59°C por 7 horas, correspondendo a condições de alta e baixa especificidade, respectivamente.

2.4. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP

Dezoito amostras de tomateiro coletadas no Triângulo Mineiro foram selecionadas para análise de PCR-RFLP, com prioridade para aquelas a partir das quais se amplificaram fragmentos de DNA viral de comprimentos distintos em relação ao complexo viral de referência, TGV-Ub1, e aos isolados TGV-Ub1-peq e TRMV, e escolhendo-se amostras que hibridizaram ou não com a sonda RFUb49-total a 59°C em análise de “Southern blot”.

A análise foi realizada utilizando-se as enzimas *MspI*, *Hinfi* e *TaqI* (GibcoBRL), todas com seqüência de reconhecimento formada por quatro nucleotídeos. Os produtos de amplificação obtidos foram purificados utilizando-se o kit “Concert Rapid PCR Purification” (GibcoBRL) e quantificados visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%) corado com brometo de etídeo. Os produtos foram então submetidos a clivagem com as diferentes enzimas, de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle, utilizaram-se isolados previamente caracterizados de TCMV e TGV-Ig2 (AMBROZEVICIUS, 2000). Os produtos das clivagens foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídeo. Com base nos padrões de clivagem obtidos foram preparadas matrizes, nas quais cada coluna representa uma amostra e cada linha representa um fragmento de

DNA. O valor 0 foi atribuído à ausência de fragmento para determinada amostra viral numa determinada posição, e o valor 1 foi atribuído à presença do fragmento. A partir das matrizes foram preparados gráficos de dispersão genética com base no método UPGMA, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 1999).

3. RESULTADOS

3.1. Detecção de geminivírus em tomateiros na região do Triângulo Mineiro

Do total de 170 amostras de tomateiros coletadas, a presença de begomovírus foi detectada via PCR em 148 amostras (Quadro 23). Em Araguari, 82,3 % das amostras coletadas estavam infectadas, em Indianópolis o índice foi de 92,0 %, e em Uberlândia 88,6 %. Estes são dados da ocorrência de quaisquer vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*, sem discriminação de espécie. As amostras apresentavam sintoma típico de mosaico dourado, mas com a presença de vários outros sintomas combinados a este. Em várias propriedades foram observados diferentes grupos de amostras com combinações de sintomas distintos entre si, para uma mesma cultivar e uma única propriedade amostrada. Por outro lado, várias combinações de sintomas foram observadas em mais de uma propriedade.

A amplificação de fragmentos virais com diferentes tamanhos utilizando-se o mesmo par de oligonucleotídeos constitui um indício da presença de espécies distintas de begomovírus nas amostras analisadas.

Quadro 23 - Geminivírus em tomateiros amostrados em lavouras nos municípios de Araguari, Indianópolis, e Uberlândia, região do Triângulo Mineiro, em junho de 2000*

Município	Código das amostras coletadas por lavoura	Número de amostras infectadas/total de amostras de tomateiro coletadas (%)
Araguari	D1 a 7	7/7 (100)
	E1 a 6	6/6 (100)
	F1 a 4	2/4 (50)
	G1 a 5	3/5 (60)
	H1 a 3	2/3 (67)
	I1 a 10	10/10 (100)
	J1 a 11	9/11 (82)
	L1	0/1 (0)
	Q1 a 15	12/15 (80)
Sub-total Araguari		51/62 (82)
Indianópolis	M1 a 13	10/13 (78)
	N1 a 15	15/15 (100)
	O1 a 7	7/7 (100)
	P1 a 15	14/15 (93)
Sub-total Indianópolis		46/50 (92)
Uberlândia	A1 a 9	3/9 (33)
	B1 a 3	2/3 (67)
	C1 a 15	14/15 (93)
	R1 a 16	16/16 (100)
	S1 a 15	15/15 (100)
Sub-total Uberlândia		51/58 (88)
Total		148/170 (87)

* PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para o componente A de begomovírus.

3.2. Análise da diversidade genética com base na amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR

A Figura 35 apresenta a comparação do tamanho e do número de fragmentos amplificados a partir da maioria das amostras coletadas no campo, e os fragmentos amplificados a partir do complexo TGV-Ub1 e dos isolados TGV-Ub1-peq e TRMV. A maioria dos fragmentos amplificados a partir das amostras apresentou um tamanho intermediário entre o fragmento amplificado a partir do TRMV e do isolado TGV-Ub1-peq, e em todas as propriedades houve amostras a partir das quais amplificaram-se dois ou mais fragmentos com tamanhos distintos, indicando a ocorrência de infecções mistas. As cinco amostras coletadas na propriedade D e uma amostra da propriedade Q apresentaram fragmentos de tamanho maior do que o amplificado a partir do TRMV.

3.3. Análise da diversidade genética com base em hibridização molecular

Todas as amostras foram analisadas por “Southern blot” com as sondas RFUb49-total e Ub49(A1-496) para identificação de amostras com seqüências de nucleotídeos apresentando diferentes níveis de homologia em relação ao TRMV. Hibridização com a sonda RFUb49-total a 59°C foi capaz de detectar outra espécie de geminivírus que infecta o tomateiro, o TCMV (isolado TGV-Ig1), mas não detectou um fragmento de DNA mitocondrial clonado em pUb1-50 (Figura 20, Capítulo 1) ou DNA de planta sadia. Portanto, nestas condições de hibridização esta sonda apresentou a capacidade de detectar pelo menos duas espécies de geminivírus sem detectar DNA da planta. Não se pode afirmar, entretanto, que a sonda detecte qualquer geminivírus, pois não detectou outros begomovírus, por exemplo o TGMV, TGV-C12 e SbGV-RF35 (Figuras 20 e 21, Capítulo 1), e não foi testada a detecção de outras espécies taxonomicamente mais distantes em relação ao TRMV. Hibridização com a sonda Ub49(A1+496) a

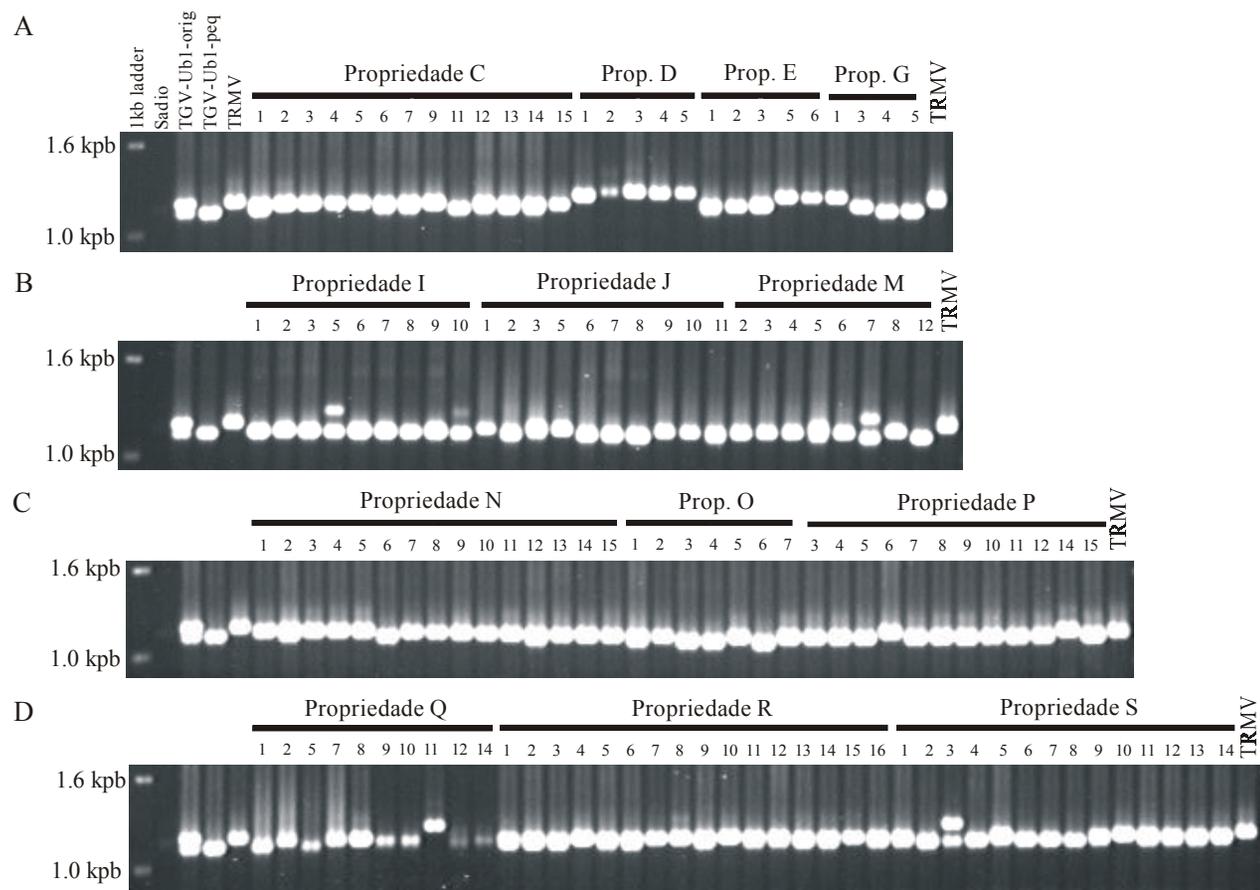


Figura 35 - Resultado da análise da diversidade genética de geminivírus nos tomateiros coletados no Triângulo Mineiro com base no tamanho do fragmento amplificado via PCR. As letras indicam propriedades rurais e os números indicam as amostras de tomateiro, conforme o Quadro 23.

68°C foi capaz de detectar apenas o componente A do TRMV, e não detectou TCMV ou TGV-Ub1-peq. Portanto, nestas condições de hibridização a sonda foi capaz de discriminar o componente A do TRMV. Utilizando-se a sonda Ub49(A1+496) e hibridização a 68°C por 19 horas, apenas a amostra A1 foi detectada (dados não apresentados).

Os resultados da hibridização com a sonda RFUb49-total a 59°C por 7 horas são apresentados na Figura 36. Nestas condições, a sonda não detectou os fragmentos de PCR amplificados a partir das amostras A7, C8, C11, D1-4, E5-6, F4, G1, G4-5, H3, I1-4, I6-10, J2, J6-8, M12, N6, O2-3, O6, P6, P14, Q1, Q5, S4, S6, S8, S15 (de tomateiro) e L2 (de *Sida* sp.). Esse resultado sugere que os vírus presentes nessas amostras pertencem a espécies distintas do TRMV e provavelmente pouco relacionadas a esse vírus.

Os vírus que diferiram da maioria com relação ao tamanho do fragmento amplificado via PCR, ou cujos fragmentos não foram detectados pela sonda RFUb49-total a 59°C, foram selecionados para análise de variabilidade genética por PCR-RFLP, a fim de se obter evidências mais concretas da existência de espécies distintas de begomovírus.

3.4. Análise da diversidade genética com base em PCR-RFLP

Diversos padrões de clivagem distintos foram obtidos após a clivagem dos fragmentos amplificados a partir das amostras do Triângulo Mineiro com as enzimas *Msp*I, *Hinf*I e *Taq*I (Figura 37). Entretanto, vírus que apresentaram o mesmo padrão de clivagem para *Msp* I também apresentaram padrões iguais para as enzimas *Hinf*I e *Taq*I. Dessa forma, o gráfico de dispersão genética (Figura 38) preparado a partir dos resultados de PCR-RFLP reflete com precisão o relacionamento entre os vírus.

O gráfico separou as amostras analisadas em quatro grupos. As amostras que hibridizaram com a sonda RFUb49-total a 59°C (A5, C3, C6, e S13 de

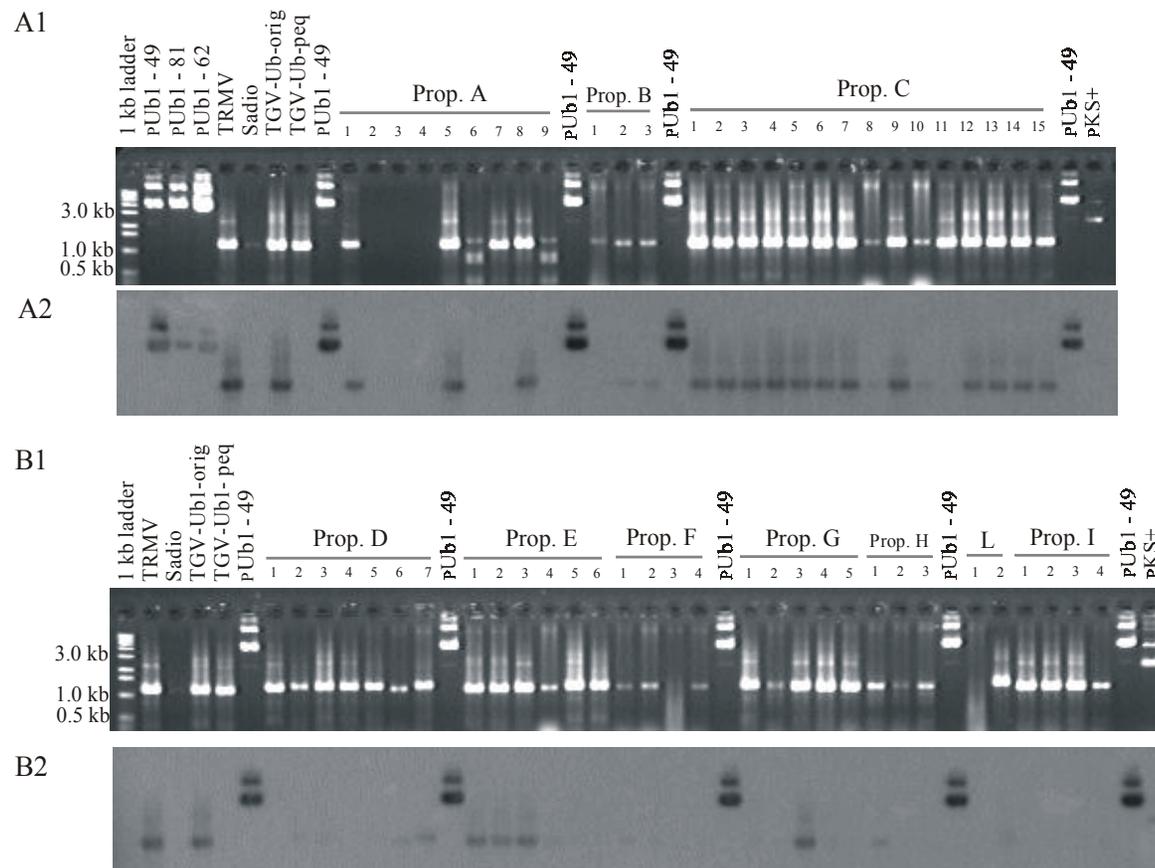


Figura 36 - Resultado da análise da diversidade genética de geminivírus nos tomateiros coletados no Triângulo Mineiro com base na análise de “Southern blot”, utilizando a sonda RFUbl49-total marcada com digoxigenina. (A1) e (B1), DNA amplificado via PCR a partir das amostras de tomateiro. As letras indicam propriedade rural e os números indicam as amostras de tomateiro, conforme o Quadro 23. (A2) e (B2), Hibridização dos fragmentos amplificados via PCR com a sonda RFUbl49-total, a 59°C por 7 horas.

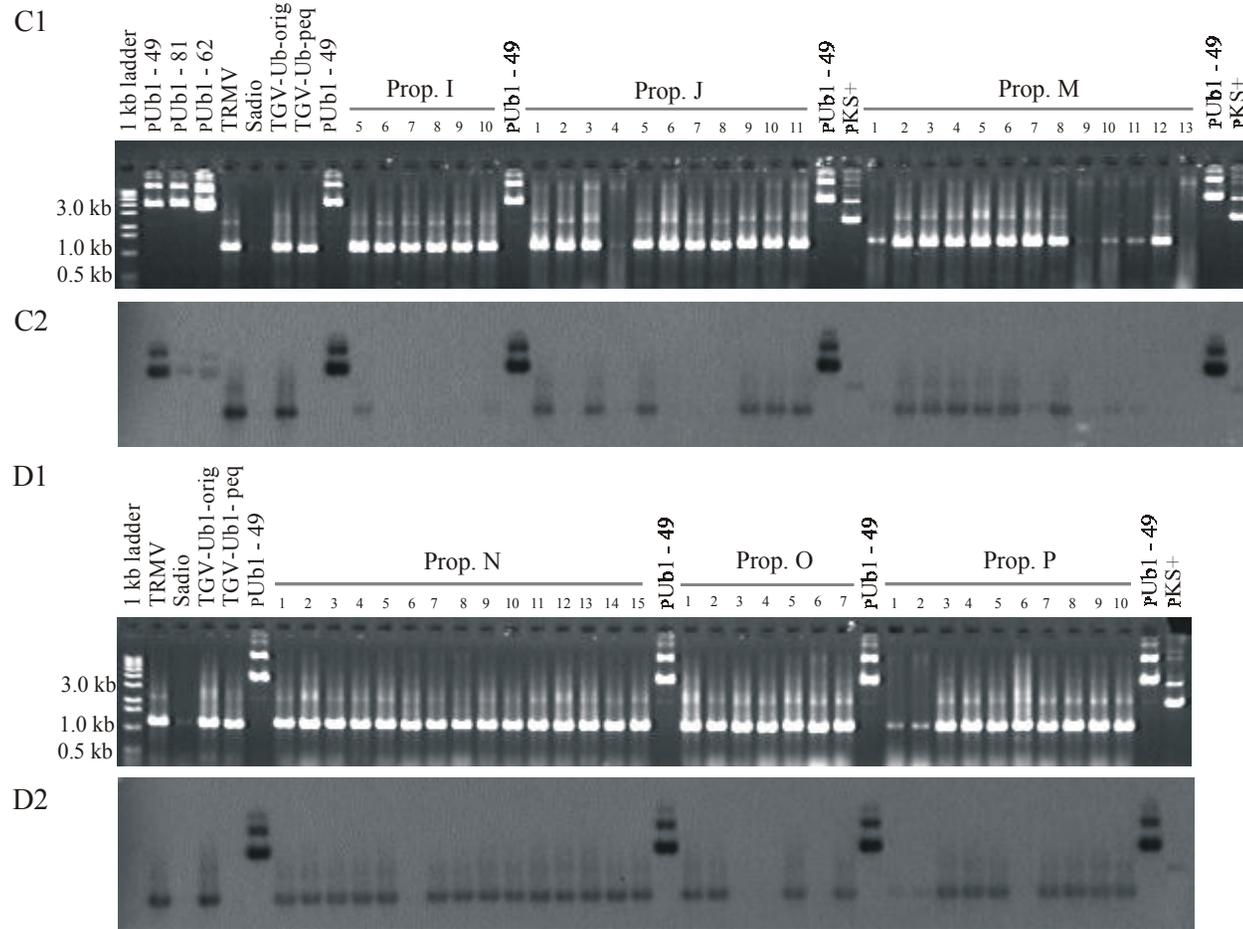


Figura 36, Cont.

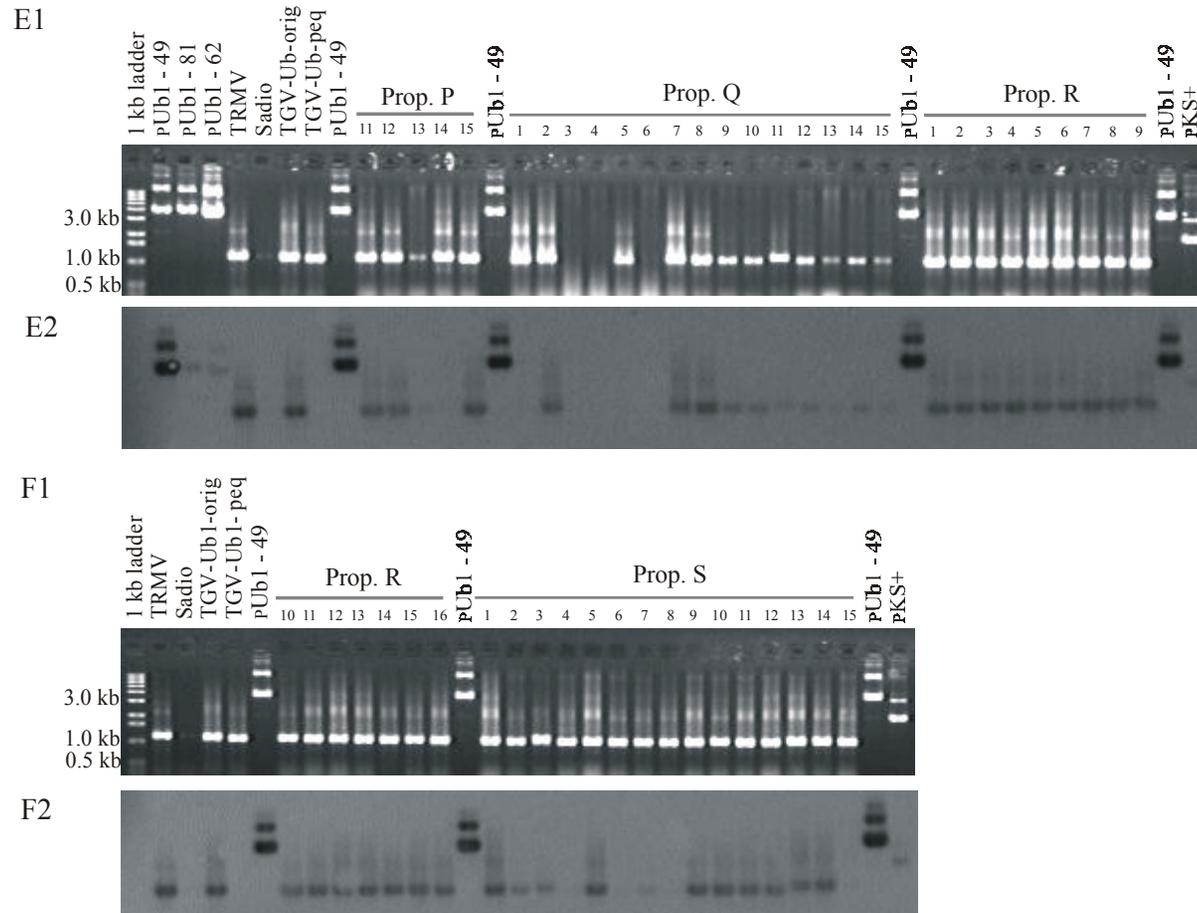


Figura 36, Cont.

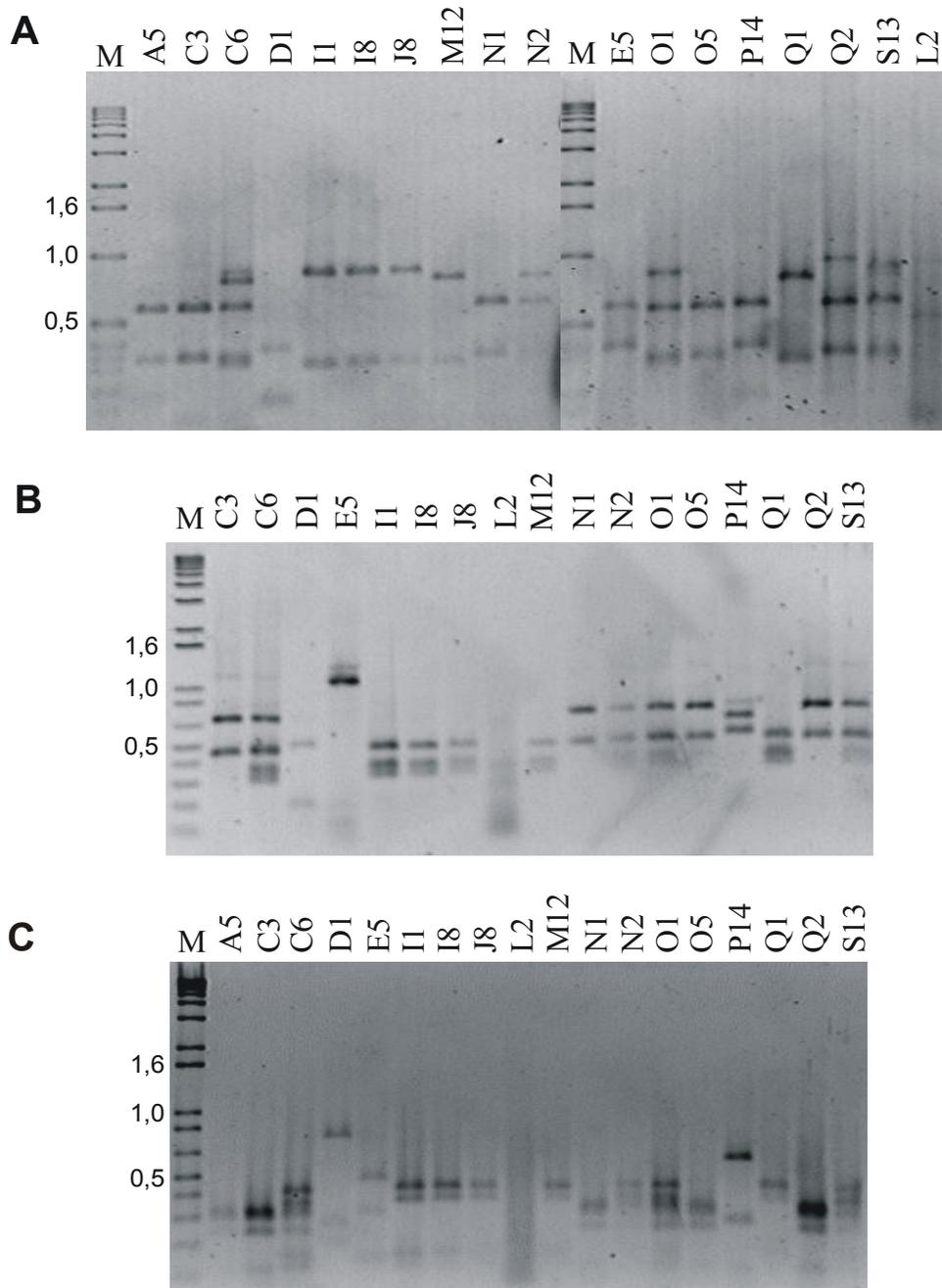


Figura 37 - Padrões de clivagem pelas enzimas *MspI* (A), *HinfI* (B) e *TaqI* (C) de fragmentos amplificados via PCR a partir de amostras de tomateiro com sintomas de infecção por geminivírus coletadas no Triângulo Mineiro. As letras referem-se à propriedade rural onde as amostras foram coletadas, e os números a cada amostra individual, conforme o Quadro 23. **M**, marcador (“1 kb DNA ladder”, em kbp).

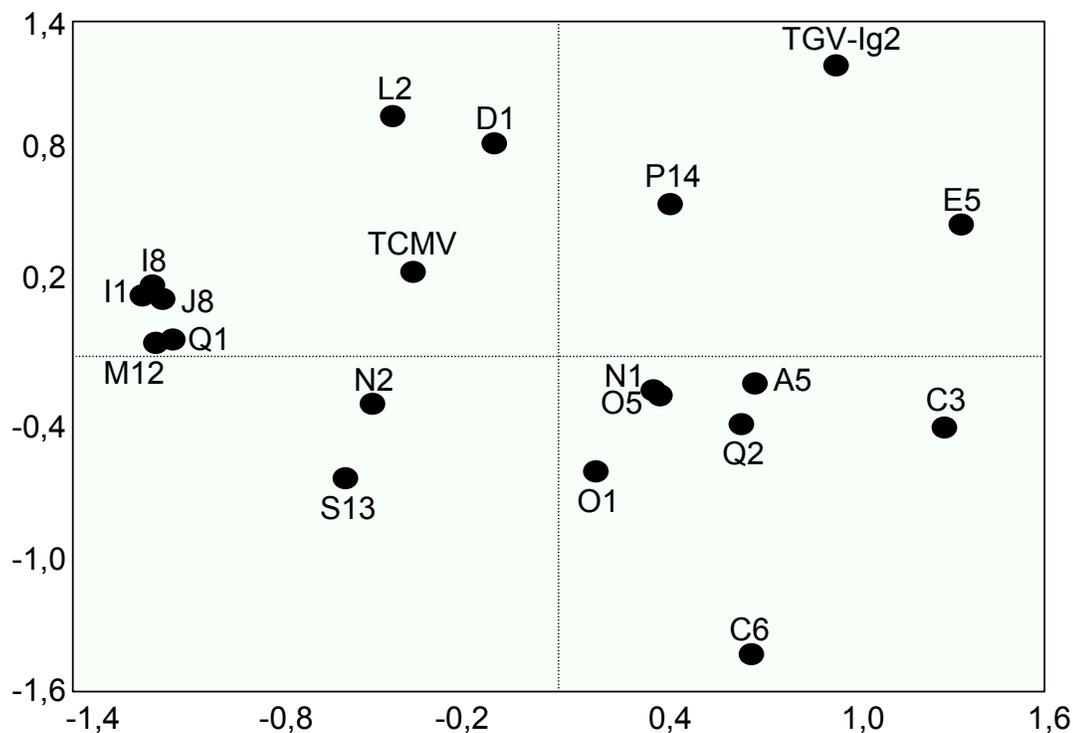


Figura 38 - Gráfico de dispersão genética preparado com base nos resultados de PCR-RFLP. O procedimento envolveu as informações geradas pela utilização conjunta das 3 enzimas de restrição. Análise de escala multidimensional aplicada à matriz de distâncias obtida por concordância simples. TCMV, *Tomato chlorotic mottle virus*; TGV-Ig2, isolado de geminivírus coletado em Igarapé, MG.

Uberlândia, N1, N2, O1 e O5 de Indianópolis, e Q2 de Araguari) estão agrupadas (com exceção das amostras N2 e S13) (Figura 38), confirmando a especificidade da sonda nessas condições de hibridização. Entre as amostras que não hibridizaram com a sonda nas condições mencionadas, aquelas coletadas em Araguari (D1, E5, I1, I8, J8, L2 e Q1) se agruparam, com exceção da amostra E5. Já as amostras de Indianópolis (M12 e P14) se localizaram em grupos distintos.

4. DISCUSSÃO

Do total de 170 amostras de tomate coletadas, a presença de begomovírus foi detectada via PCR em 148 amostras. Em Araguari 82% das amostras de tomate coletadas estavam infectadas. No município de Indianópolis o índice foi de 92%, e em Uberlândia 87%. É importante salientar que estes dados são de ocorrência de begomovírus, sem discriminação de espécie, pois as reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos universais, capazes de detectar qualquer espécie pertencente a esse gênero. Além disso, esses dados não podem ser interpretados em termos de incidência de begomovírus no campo, uma vez que foram coletados apenas ramos de plantas apresentando os sintomas típicos de mosaico dourado e deformação foliar. Outros vírus podem estar presentes nas amostras em que não foi detectada infecção por begomovírus.

Uma primeira avaliação da diversidade genética existente entre as amostras foi fornecida pela análise eletroforética dos fragmentos amplificados, observando-se a presença de bandas de tamanhos distintos. A maioria dos fragmentos amplificados a partir das amostras tinha tamanhos diferentes dos fragmentos amplificados a partir de DNA do TRMV e do TGV-Ub1-peq, constituindo um indício de que a maioria dos vírus detectados pode pertencer a espécies de begomovírus distintas do TRMV e do TGV-Ub1-peq. Estes resultados estão em acordo com a observação de infecções mistas entre begomovírus em condições naturais em tomateiro (UMAHARAN et al., 1998; TORRES-PACHECO et al., 1996), em outras culturas (NAVAS-CASTILHO et

al. 2000; UMAHARAN et al., 1998; TORRES-PACHECO et al., 1996) e em plantas silvestres (SAUNDERS et al., 2001; UMAHARAN et al., 1998; ROYE et al., 1997). Infecções mistas entre begomovírus, com amplificação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos foram observadas por UMAHARAN et al. (1998) e por ROYE et al. (1997).

A utilização de fragmentos de DNA amplificados via PCR garante que a quantidade de DNA para a hibridização com a sonda seja elevada, significativamente acima do nível de detecção. Desta forma, resultados negativos de hibridização podem ser atribuídos à existência de diferenças nas seqüências de nucleotídeos entre o DNA viral e a sonda, as quais foram suficientes para impedir a hibridização. A hibridização da sonda Ub49(A1-496) a 68°C, altamente específica para o componente A do TRMV (item 3.5, Capítulo 1), indicou que apenas a amostra A1 é totalmente homóloga ao TRMV-A. Esta amostra foi coletada no mesmo município onde foi coletado o complexo viral TGV-Ub1, mas em propriedade aproximadamente a 50 km de distância do local de coleta do TGV-Ub1. Nenhuma amostra foi coletada exatamente no local de origem deste complexo, pois não havia cultura de tomate nesta área na época de amostragem. Contudo, considerando-se apenas o município de Uberlândia, a propriedade onde foi coletada a amostra A1 foi a mais distante do ponto de coleta do TGV-Ub1. Salienta-se que o complexo TGV-Ub1 foi coletado em maio de 1996, durante as primeiras epidemias de geminivírus em tomates no Triângulo Mineiro.

A hibridização com a sonda RFUb49-total a 59°C também detecta o TRMV-A (item 3.5, Capítulo 1), mas é importante lembrar que esta temperatura inferior possibilita a hibridização com seqüências de menor homologia, em comparação à hibridização realizada a 68°C. Além disto, a sonda RFUb49-total é composta do genoma completo do TRMV-A, incluindo regiões do genoma conservadas entre geminivírus, o que aumenta a probabilidade de detecção de vírus menos relacionados.

A hibridização do DNA amplificado de amostras de tomateiro com a sonda RFUb49-total a 59°C detectou o DNA da maioria das amostras, não

detectando apenas 40 amostras. Estes resultados sugerem que a maioria das amostras estava infectada com begomovírus de homologia significativa com o TRMV-A, possivelmente suficiente para serem considerados como pertencentes a esta espécie, e que as 40 amostras não detectadas provavelmente pertencem a outra espécie de begomovírus. Estudando a diversidade genética entre geminivírus que infectam três plantas daninhas da Jamaica, ROYE et al. (1997) utilizaram sonda preparada com fragmento de DNA do SiGMV-JA em hibridizações à 60°C. Os autores interpretaram reações positivas no teste de hibridização como detecção de isolados pertencentes à mesma espécie, e as reações negativas de hibridização do DNA viral presente em amostras infectadas como a ausência do vírus analisado naquela amostra. Desta forma, concluíram que o SiGMV-JA era amplamente distribuído na Jamaica.

Em conjunto, os resultados das hibridizações com as sondas RFUb49-total e Ub49(A1-496) indicam que na época desta amostragem o TRMV era a espécie de geminivírus predominante em lavouras de tomate da região do Triângulo Mineiro, e sugerem a existência de outras espécies de geminivírus ocorrendo em tomate nesta região. A detecção de apenas uma amostra com a sonda Ub49(A1-496) e da maioria das amostras com a sonda RFUb49-total sugere que o TRMV, detectado e isolado em amostras coletadas em 1996, sofreu modificações em sua seqüência de nucleotídeos ao longo dos anos, provavelmente como consequência de mutações e/ou recombinação, e que os vírus predominantes na região na época de amostragem do presente trabalho (1999), apresentam um relacionamento um pouco mais distante em relação ao TRMV, embora ainda sejam semelhantes o suficiente a ponto de serem considerados como pertencentes a esta espécie.

A análise da diversidade genética com base em PCR-RFLP foi realizada em uma fração das amostras de tomateiro coletadas. Estas amostras foram selecionadas com base nos critérios previamente analisados, de modo a representarem toda a variabilidade existente nas amostras coletadas. A representatividade da seleção foi confirmada pelos resultados de PCR-RFLP, pois estes apresentaram consistência entre as três enzimas utilizadas na análise e

com os resultados de hibridização com a sonda RFUb49-total a 59°C. A análise utilizada (dispersão genética) indica o grau de relacionamento taxonômico entre os vírus, entretanto não indica relacionamento filogenético (ou seja, não indica relações de descendência entre os vírus analisados). Árvores filogenéticas também foram preparadas, entretanto estas apresentaram baixa significância, provavelmente devido ao pequeno número de fragmentos polimórficos avaliados nos géis de agarose, ou pelo baixo número de amostras analisadas. Optou-se portanto por um tipo de análise que, embora fornecendo menos informações a respeito do relacionamento entre os vírus, apresentou um nível de significância estatística maior.

Todas as amostras que hibridizaram com a sonda RFUb49-total a 59°C se agruparam, com exceção das amostras N2 e S13. Isso confirma os resultados da hibridização molecular, indicando que esses vírus são de fato relacionados taxonomicamente. O uso dessa sonda nessas condições de hibridização fornece portanto uma indicação precisa da presença do TRMV em plantas infectadas. É possível que tais condições de hibridização possam ser utilizadas com outras sondas correspondentes ao genoma completo de outros geminivírus, constituindo assim um método geral de detecção de espécies de begomovírus.

Entre as amostras que não hibridizaram com a sonda, todas as amostras de Araguari se agruparam, com exceção das amostras E2 e Q2. Esse resultado indica que os vírus predominantes nessa área são taxonomicamente relacionados, embora vírus distintos também estejam presente, em menor proporção. Em Indianópolis ocorreu o oposto: as amostras que hibridizaram com a sonda (N1, O1 e O5) se agruparam conforme esperado, entretanto as demais amostras estão totalmente dispersas no gráfico, indicando baixo grau de relacionamento filogenético. Todas as amostras de Uberlândia se agruparam, conforme esperado, uma vez que todas hibridizaram com a sonda RFUb49-total.

Em conjunto, os resultados indicam a existência de um alto grau de diversidade genética entre begomovírus infectando tomateiro no Triângulo Mineiro. Amostras com baixo relacionamento filogenético foram encontrados no mesmo campo (p.ex., amostras Q1 e Q2), e amostras com alto relacionamento

filogenético foram encontradas em campos diferentes (p. ex., amostras N1 e O5 de Indianópolis, amostras I1, I8 e J8 de Araguari), e mesmo em localidades diferentes (p.ex., amostras M12 e Q1 de Indianópolis e Araguari, respectivamente). Estes resultados contrastam com as observações realizadas por FARIA e MAXWELL (1999) quanto a ausência de variabilidade do BGMV na cultura do feijão no Brasil. Contudo, estes autores analisaram apenas amostras com sintomas típicos de mosaico dourado no feijoeiro, enquanto que as amostras de tomateiro coletadas no Triângulo Mineiro em 2000 apresentavam diferentes tipos de sintomas combinados ao sintoma principal, o mosaico dourado. Além disto, não se deve esquecer que a cultura do feijão no Brasil também é atacada por outros geminivírus, por exemplo o BDMV (COSTA, 1975). Considerando a sintomatologia, é importante lembrar que GARRIDO-RAMIREZ et al. (2000) observaram que as variações de sintomas causados por estirpes do BGYMV (anteriormente BGMV tipo II) estão associadas ao componente B deste begomovírus, e que para a avaliação da diversidade genética destes vírus é importante sequenciar a região mais variável deste componente, o que não foi avaliado por FARIA e MAXWELL (1999). Por outro lado, considerando que a diversidade genética dos begomovírus é influenciada pela sua relação com a mosca-branca vetora (POWER, 2000), a alta diversidade verificada na região do Triângulo Mineiro, e em outras regiões do Brasil (AMBROZEVICIUS, 2000; RIBEIRO et al., 2002) pode ser devida à recente interação entre o biótipo B de *Bemisia tabaci*, recentemente introduzido no Brasil (LOURENÇÃO e NAGAI, 1994; FRANÇA et al., 1996; HAJI et al., 1996; RIBEIRO et al., 1998), e isolados de geminivírus presentes em plantas hospedeiras cultivadas e silvestres desta região. A baixa diversidade genética do BGMV (FARIA e MAXWELL, 1999) refletiria o longo tempo de sua interação com o biótipo A de *Bemisia tabaci* (COSTA, 1976).

Os resultados de infecção mista de geminivírus em tomateiro no Triângulo Mineiro concordam com a observação de infecções mistas de geminivírus em tomateiro no nordeste Brasileiro (BEZERRA et al. 1997). A ocorrência de infecções mistas entre diferentes espécies e entre diferentes estirpes

de uma mesma espécie de begomovírus em tomateiro também tem sido observada em outros países. Por exemplo, o TYLCV-Sr e o TYLCV-Is em tomateiro na Espanha (SÁNCHEZ-CAMPOS, et al. 1999), o PHV, suas estirpes e outros begomovírus em tomateiros e pimentão no México (TORRES-PACHECO et al., 1996), e diferentes espécies e estirpes de begomovírus infectando o tomateiro em Trinidad e Tobago (UMAHARAN et al., 1998). Infecções mistas tornam os sintomas mais severos e mais complexos, o que contribui para agravar o problema no campo e dificulta o controle da doença.

Esse alto grau de diversidade genética entre vírus que não ocorriam em tomateiros no Brasil há sete anos sugere a transferência de vírus previamente existentes em outras plantas para o tomateiro, por exemplo, em plantas silvestres que geralmente apresentam sintomas de infecção viral semelhantes aos sintomas causados por geminivírus, mas cuja etiologia ainda não foi determinada, ou em outras espécies cultivadas, como o feijão-vagem, que é freqüentemente cultivado ao lado ou entre plantas de tomate. A introdução de vírus via material genético importado certamente levaria a uma uniformidade genética muito maior entre isolados no campo. No entanto, uma análise mais detalhada dos resultados demonstra que, após sete anos de adaptação ao novo hospedeiro (um período de tempo extremamente curto), já ocorre uma predominância de alguns isolados em certas regiões geográficas. Assim, AMBROZEVICIUS (2000) demonstrou que o TGV-Ig1 (TCMV) predomina na Zona Metalúrgica de MG, e que o isolado RJ-SF10 predomina no norte do RJ e no ES. Os resultados aqui analisados demonstram que atualmente o TRMV predomina no Triângulo Mineiro, embora vírus geneticamente distintos possam ser encontrados no campo.

Em termos práticos, o alto grau de diversidade genética entre geminivírus infectando tomateiros no Brasil é um fator complicador em programas de melhoramento genético visando a resistência do hospedeiro. O sucesso de tais programas dependerá da identificação de fontes de resistência de amplo espectro, ou da incorporação de múltiplas fontes de resistência eficientes contra diferentes espécies de vírus. Entretanto, levando-se em conta a rápida adaptação de geminivírus ao novo hospedeiro, é possível que novas espécies

passem a predominar em grandes áreas ou mesmo em todo o país a médio ou longo prazo. Nesse contexto, a busca de fontes de resistência eficientes contra as espécies encontradas atualmente pode significar um desperdício de recursos, pois tais espécies podem não estar mais presentes no campo no momento em que cultivares resistentes contendo tais fontes estejam disponíveis para o plantio. Seria de grande valia que os melhoristas trabalhassem junto aos virologistas, monitorando constantemente a evolução das espécies de geminivírus em tomateiro e sua dispersão nas diferentes regiões produtoras, de modo a otimizar a incorporação de fontes de resistência eficientes contra as espécies predominantes em cada região. Ao mesmo tempo, programas de melhoramento baseados em resistência derivada do patógeno devem ser iniciados, com vistas à obtenção de resistência de amplo espectro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUZID, A.M., POLSTON, J.E., HIEBERT, E. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 3225-3229, 1992.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410, 1990.
- AMBROZEVÍCIUS, L.P. **Caracterização parcial de uma nova espécie de *Begomovirus*, e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro no Sudeste do Brasil**. Viçosa : UFV, 81p., 2000. (Tese MS)
- ANÔNIMO. Mosca Branca e as geminiviroses do tomateiro. **Boletim Técnico EMBRAPA-CNPQ**, Brasília, 4 p. , 1996.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R., GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. **Virology**, v. 203, p. 90-100, 1994a.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 553-556, 1994b.

- ASHBY, M.K., WARRY, A., BEJARANO, E.R., KHASHOGGI, A., BURRELL, M., LICHTENSTEIN, C.P. Analysis of multiple copies of geminiviral DNA in the genome of four closely related *Nicotiana* species suggests a unique integration event. **Plant Molecular Biology**, v.35, p. 313-321, 1997.
- AZZAM, O., FRAZER, J., DE LA ROSA, D., BEAVER, J.S., AHLQUIST, P., MAXWELL, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology**, v. 204, p. 289-296, 1994.
- BECK, D.L., VANDOLLEWEERD, C.J., LOUGH, T.J., BALMORI, E., VOOT, D.M., ANDERSEN, M.T., OBRIEN, I.E.W., FOSTER, R.L.S. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant-viruses with a triple gene block. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 94, p. 10310-10314, 1994.
- BEJARANO, E.R., KHASHOGGI, A., WITTY, M., LICHTENSTEIN, C.P. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p. 759-764, 1996.
- BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., RIBEIRO, S.G., GIORDANO, L.B., ZERBINI, F.M., ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 331, 1997.
- BEZERRA, I.C., ROCHA, H.G.C., LIMA, M.F., NUNES, M.U.C. LOPES, E.S., ÁVILA, A.C. New record of geminivirus occurring in northeast region of Brazil. **Virus Reviews e Research**, v. 3, p. 143, 1998.
- BRIDDON, R.W., MARKHAM, P.G. Family *Geminiviridae*. In: MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 10 (Supplementum), p. 158-185, 1995.
- BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI, J., MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, v.219, p. 387-394, 1996.
- BRIDDON, R.W., PINNER, M.S., STANLEY, J., MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.

- BROWN, J.K., BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, p. 220-225, 1992.
- BROWN, J.K., NELSON, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. **Plant Disease**, v. 72, p. 866-869, 1988.
- BROWN, J.K., POULOS, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. **Plant Disease**, v. 74, p. 720, 1990.
- BUCK, K.W., COUTTS, R.H.A. Tomato golden mosaic virus. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, v. 303, p. 1-6, 1985.
- CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, S.K., SCHAAD, M. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**, v. 8, p. 1669-1681, 1996.
- COHEN, S., DUFFUS, J.E., LIU, H.Y. Acquisition, interference, and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. **Phytopathology** v. 79, p. 109-113, 1989.
- CONTTS, R.H., COFFIN, R.S., ROBERTS, E.J., HAMILTON, W.D. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1515-1520, 1991.
- COOPER, B., LAPIDOT, M., HEICK, J.A., DODDS, J.A., BEACHY, R.N. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. **Virology**, v. 206, p. 307-313, 1995.
- COSTA, A.S, OLIVEIRA, A.R., SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 6, p. 171, 1975.
- COSTA, A.S., CARVALHO, A.M. Comparative studies between *Abutilon* and *Euphorbia* mosaic viruses. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.38, p.129-152, 1960.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: BIRD, J., MARAMOROSCH, K. Eds. **Tropical Diseases of Legumes**. New York:Academic Press, 171 p., 1975.

- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, p. 429-449, 1976.
- CREAMER, R., LUQUE-WILLIAMS, M., HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. **Plant Disease**, v. 80, p. 533-536, 1996.
- CRESPI, S., NORIS, E., VAIRA, A., ACCOTTO, G. Molecular characterization of cloned DNA from a tomato yellow leaf curl virus isolate from Sicily. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 34, p. 93-99, 1995.
- CRUZ, C. D. **Genes**. Viçosa, MG: UFV, 1999.
- CZOSNEK H., LATERROT H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1391-1406, 1997.
- DAVIES, J.W., STANLEY, J., DONSON, J., MULLINEAUX, P.M., BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. **Journal of Cell Science**, v. 7 (Supplement), p. 95-107, 1987.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DEOM, C.M., LAPIDOT, M., BEACHY, R.N. Plant virus movement proteins. **Plant Cell**, v. 69, p. 221-224, 1992.
- DESBIEZ, C., DAVID, C., METTOUCHI, A., LAUFS, J., GRONENBORN, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 5640-5644, 1995.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analyses programs for the VAX. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 387-395, 1984.
- DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B.A.M., MULLINEAUX, P.M., BOULTON, M.I., DAVIES, J.W. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion associated. **EMBO Journal**, v.3, p. 3069-3073, 1984.
- EAGLE, P.A., HANLEY-BOWDOIN, L. Cis-elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. **Journal of Virology**, v. 71, p. 6947-6955, 1997.

- EAGLE, P.A., OROZCO, B.M., HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **Plant Cell**, v. 6, p. 1157-1170, 1994.
- FAJARDO, T.V.M., ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. Doenças causadas por vírus em tomate. *In*: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R. e COSTA, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças**, v. 2, p. 843-877. Viçosa:Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2000.
- FAO. FAOSTAT - Agricultural Statistics Database. <http://www.fao.org/waicent/agricult.htm>, 1998.
- FARGETTE, D., LESLIE, M., HARRISON, B.D. Serological studies on the accumulation and localisation of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. **Annals of Applied Biology**, v. 128, p. 317-328, 1996.
- FARIA, J.C., MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FARIA, J.C., ZERBINI, F.M. Familia Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27-57, 2000.
- FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G., LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p. 125-137, 2000.
- FARIA, J.C., GILBERTSON, R.L., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P.G., LONIELLO, A.O., MAXWELL, D.P. Bean golden mosaic geminivirus Type II isolates from Dominican Republic and the Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, v. 84, p. 321-329, 1994.
- FARIA, J.C., SOUZA-DIAS, J.A.C., SLACK, S., MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 81, p. 423, 1997.
- FAUQUET, C., FARGETTE, D. African cassava mosaic virus: Etiology, epidemiology, and control. **Plant Disease**, v. 74, p. 404-411, 1990.
- FERNANDES, J.J., BRAZ, A.S.K., KRAUSE, R., FONTES, E.P.B., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M. Partial host range of TGV-Ub, a new tomato-infecting geminivirus from Uberlândia, MG. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 334, 1997.

- FILGUEIRA, F.A.R., FERNANDES, J.J., REZENDE, E.A., ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., GILBERTSON, R.L. Geminivirus in plurilocular tomato cultivars grown under plastic greenhouse conditions in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **First International Conference on the Processing Tomato and First International Symposium on Tropical Tomato Diseases**. Recife, PE, Brazil, 1996.
- FITCHEN, J.H., BEACHY, R.N. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.739-763, 1993.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K., KRAMER, M., Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, v.26, p. 65-69, 1960.
- FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994b.
- FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D., HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994a.
- FONTES, E.P.B., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FRANÇA, F.H, VILLAS-BÔAS, G.L., BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Annals of the Society of Entomology of Brasil**, v. 25, p. 369-372, 1996.
- FRISCHMUTH, T., STANLEY, J. Strategies for the control of geminivirus diseases. **Seminars in Virology**, v. 4, p. 329-337, 1993.
- FRISCHMUTH, T., ENGEL, M., LAUSTER, S., JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2675-2682, 1997.
- GARRIDO-RAMIREZ, E.R., SUDARSHANA, M.R., GILBERTSON, R.L. *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germplasm screening. **Phytopathology**, v. 90, p. 1224-1232, 2000.

- GARRIDO-RAMIREZ, E.R., SUDARSHANA, M.R., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic virus BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1184-1194, 2000.
- GHANIM, M., MORIN, S., ZEIDAN, M., CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, v.240, p. 295-303, 1998.
- GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P., MAXWELL, D.P., RUSSELL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. **Phytopathology**, v. 81, p. 980-985, 1991a.
- GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, H.S., PAPLOMATAS, E.J., ROJAS, M.R., HOU, Y.M., MAXWELL, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 23-31, 1993.
- GILBERTSON, R.L., ROJAS, M.R., RUSSELL, D.R., MAXWELL, D.P. Use of asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2843-2848, 1991b.
- GODINEZ-HERNANDEZ, Y., ANAYA-LOPEZ, J.L., DIAZ-PLAZA, R., GONZALEZ-CHAVIRA, M., TORRES-PACHECO, I., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F., GUEVARA-GONZALEZ, R.G. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. **HortScience**, v. 36, p. 139-142, 2001.
- GONÇALVES, P.M.R., JULIATTI, F.C., FERNANDES, J.J., TAKATA, S.M.S., SILVA, O.A., GOULART, L.R., MILITÃO-NETO, V. Efeito da época de inoculação em casa-de-vegetação na determinação de perdas por geminivírus no tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 335, 1997.
- GOODMAN, R.M. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. **Virology**, v. 83, p. 171-179, 1977.
- GRONING, B.R., HAYES, R.J., BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 721-726, 1994.

- HAJI, F.N.P., LIMA, M.F., ALENCAR, J.A., PREZOTTI, L. Mosca-branca: Nova praga na região do Submédio São Francisco. **Horticultura Brasileira**, v. 14, p. 88, 1996.
- HALEY, A., RICHARDSON, K., ZHAN, X., MORRIS, B. Mutagenesis of the BC1 and BV1 genes of African cassava mosaic virus identifies conserved amino acids that are essential for spread. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1291-1298, 1995.
- HAMILTON, W.D., STEIN, V.E., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: Potential coding regions and regulatory sequences. **EMBO Journal**, v. 3, p. 2197-2205, 1984.
- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J.S., ROGERS, S.G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 87, p. 1446-1450, 1990.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, p. 71-106, 1999.
- HARRISON, B.D., ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 369-398, 1999.
- HARRISON, B.D., BARKER, H., BOCK, K.R., GUTHRIE, E.J., MEREDITH, G., ATKINSON, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 270, p. 760-762, 1977.
- HARRISON, B.D., ZHOU, X., OTIM-NAPE, G.W., LIU, Y., ROBINSON, D.J. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. **Annals of Applied Biology**, v. 131, p. 437-438, 1997.
- HAYES, R.J., BUCK, K.W. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: Requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 10213-10222, 1989.
- HERSKOWITZ, I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. **Nature**, v. 329, p. 219-222, 1987.

- HILL, J.E., STRANDBERG, J.O., HIEBERT, E., LAZAROWITZ, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, v. 250, p. 283-292, 1998.
- HÖFER, P., ENGEL, M., JESKE, H., FRISCHMUTH, T. Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 1019-1022, 1997b.
- HÖFER, P., ENGEL, M., JESKE, H., FRISCHMUTH, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Journal of General Virology**, v.78, p.1785-1790, 1997a.
- HOLLAND, J.D.E. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes** v. 16, p. 13-21, 1998.
- HONG Y.G., HARRISON B.D. Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographically separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2043-2049, 1995.
- HOU, Y.M., GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- HOWARTH, A.J., CATON, J., BOSSERT, M., GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 82, p. 3572-3576, 1985.
- HOWEEL, S.H. Physical structure and genetic organisation of the genome of maize streak virus (Kenyan isolate). **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 7359-7375, 1984.
- HULL, R., DAVIES, J. Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 11, p. 17-33, 1992.
- IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1995.
- INGHAM, A.J., PASCAL, E., LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. **Virology**, v. 207, p. 191-204, 1995.

- INGHAM, D.J., LAZAROWITZ, S.G. A single missense mutation in the BR1 movement protein alters the host range of the squash leaf curl geminivirus. **Virology**, v. 196, p. 694-702, 1993.
- JIANG, H., HOU, Y.M., GUZMAN, P., GILBERTSON, R.L. Complete nucleotide sequence of the infectious clone of tomato leaf crumple geminivirus. **Phytopathology**, v. 88, p. S44, 1998.
- JUPIN, I., DE KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F., GRONENBORN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology**, v. 204, p. 82-90, 1994.
- KAVANAHA, T.A., SPILHANE, C. Strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. **Euphytica**, v. 85, p. 149-158, 1995.
- KHEYR-POUR, A., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S., GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6763-6769, 1991.
- KIM, K.S., SHOCK, T.L., GOODMAN, R.M. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. **Virology**, v. 89, p. 22-33, 1978.
- KUNIK, T.M., SALOMON, R., ZAMAIR, D., ZEIDAN, M., MICHELSON, I., GAFNI, Y., CZOSNEK, H. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. **Bio/Technology**, v. 12, p. 500-504, 1994.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN F.A., CAMARGO, L.E.A. e REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia, Vol. 2: Doenças das Plantas cultivadas**. (3ª Ed.) São Paulo:Editora Agronômica Ceres. p. 690-719, 1997.
- LAPIDOT, M., FRIEDMANN, M., LACHAMAN, O., YEHEZKEL, A., NAHON, S., COHEN, S., PILOWSKY, M. Comparison of the resistance level to tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. **Plant Disease**, v. 81, p. 1425-1428, 1997.
- LAPIDOT, M., GAFNY, R., DING, B., WOLF, S., LUCAS, W.J., BEACHY, R.N. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 859-870, 1993.

- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S.G., SCHELL, J., GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicaton initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 3879-3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G., LAZDINS, I.B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**, v. 180, p. 58-69, 1991.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LINDBO, J.A., SILVA-ROSALES, L., DOUGHERTY, W.G. Pathogen derived resistance to potyviruses: working, but why? **Seminars in Virology**, v.4, p. 369-379, 1993.
- LIU, L., DAVIES, J.W., STANLEY, J. Mutational analysis of bean yellow dwarf virus, a geminivirus of the genus *Mastrevirus* that is adapted to dicotyledoneous plants. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2265-2274, 1998.
- LIU, L., VAN TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W., STANLEY, J. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2113-2117, 1997.
- LOMONOSSOFF, G.P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 323-343, 1995.
- LOPES, C.A., SANTOS, J.R.M. **Doenças do Tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 67 p.
- LOURENÇÃO, A.L., NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 53, p. 53-59, 1994.
- LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p. 387-411, 1994.
- MALYSHENKO, S.I., KONDAKOVA, O.A., NAVAROVA, J.V., KAPLAN, I.B., TALIANSKY, M.E., ATABEKOV, J.G. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1149-1156, 1993.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology**, 3rd ed. San Diego:Academic Press, 1991.

- MATYIS, J.C., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.R., COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 267-274, 1975.
- MCGRATH P.F., HARRISON B.D. Transmission of tomato leaf curl geminiviruses by *Bemisia tabaci*: Effects of virus isolate and vector biotype. **Annals of Applied Biology**, v. 126, p. 307-316, 1995.
- MORIONES, E., ARNÓ, J., ACCOTTO, G.P., NORIS, E., CAVALLARIN, L. First report of tomato yellow leaf curl virus in Spain. **Plant Disease** v.77, p. 953, 1993.
- MORRA, M.R., PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. **Plant Cell**, v. 12, p. 2259-2270, 2000.
- MORRIS, B., RICHARDSON, K., EDDY, P., ZHAN, X., HALEY, A., GARDNER, R. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1205-1213, 1991.
- MORRIS, B.A.M., RICHARDSON, K.A., HALEY, A., ZHAN, W., THOMAS, J.E. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. **Virology**, v. 187, p. 633-642, 1992.
- MULLINEAUX, P.M., DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B.A.M., BOUTON, M.I., DAVIES, J.W. The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. **EMBO Journal**, v. 3, p. 3063-3068, 1984.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T.J., CARRICK, K.M., HANLEY-BOWDOIN, L., ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **Plant Cell**, v. 7, p. 705-719, 1995.
- NAVAS-CASTILHO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., DÍAZ, J.A., SÁEZ-ALONSO, E., MORIONES, E. First report of tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: Coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. **Plant Disease**, v. 81, p. 1461, 1997.
- NAVAS-CASTILLO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NORIS, E., LOURO, D., ACCOTTO, G.P., MORIONES, E. Natural recombination between *Tomato yellow leaf curl virus-Is* and *Tomato leaf curl virus*. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2797-2801, 2000.

- NAVOT, N., PICHERSKY, E., ZEIDAN, M., ZAMIR, D., CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. **Virology** v. 185, p. 151-161, 1991.
- NORIS, E., VAIRA, A.M., CACIAGLI, P., MASENGA, V., GRONENBORN, B., ACCOTTO, G.P. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. **Journal of Virology**, v. 72, p. 10050-10057, 1998.
- NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v.76, p. 925-932, 1994.
- OROZCO, B.M., HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p. 24448-24456, 1998.
- OROZCO, B.M., GLADFELTER, H.J., SETTLAGE, S.B., EAGLE, P.A., GENTRY, R., HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple *cis* elements contribute to geminivirus origin function. **Virology**, v. 242, p. 346-356, 1998.
- OROZCO, B.M., MILLER, A.B., SETTLAGE, S.B., HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, v. 224, p. 390-404, 1996.
- PADIDAM, M., SAWYER, S., FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-225, 1999.
- PAPLOMATAS, E.J., PATEL, V.P., HOU, Y.M., NOUEIRY, A.O., GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible, bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v. 84, p. 1215-1224, 1994.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A.A., WARD, B.M., MEDVILLE, R., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S.G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **Plant Cell**, v. 6, p. 995-1006, 1994.
- PAXIMADIS M., IDRIS, A.M., TORRES-JEREZ, L., VILLARREAL, A., REY, M.E.C., BROWN, J.K. Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New World. **Archives of Virology**, v. 144, p. 703-717, 1999.

- PEIXOTO, J.R., SILVA, R.P., RODRIGUES, F.A., RAMOS, R.S., FARIA, V.R.C.A., JULIATTI, F.C. Avaliação da incidência de geminivírus em cultivares de tomateiro tipo 'Santa Cruz' no plantio das águas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 433, 1996.
- PETTY, I.T.D., CARTER, S.C., MORRA, M.R., JEFFREY, J.L., OLIVEY, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation is determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. **Virology**, v. 277, p. 429-438, 2000.
- PETTY, I.T.D., MILLER, C.G., MEADE-HASH, T.J., SCHAFFER, R.L. Complementable and noncomplementable host adaptation defects in bipartite geminiviruses. **Virology**, v. 212, p. 263-267, 1995.
- PICÓ, B., DÍEZ, M.J., NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus - A review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 151-196, 1996.
- PICÓ, B., SIFRES, A., ELIA, M., DIEZ, M.J., NUEZ, F. Searching for new resistance sources to tomato yellow leaf curl virus within a highly variable wild *Lycopersicon* genetic pool. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.22, p. 344-350, 2000.
- PITA, J.S., FONDONG, V.N., SANGARÉ, A., OTIM-NAPE, G.W., OGWAL, S., FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 655-665, 2001.
- PIVEN, N.M., UZCÁTEGUI, R.C., INFANTE, H.D. Resistance to tomato yellow mosaic virus in species of *Lycopersicon*. **Plant Disease**, v.79, p. 590-594, 1995.
- POLSTON, J.E., ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, v.81, p. 1358-1369, 1997.
- POLSTON, J.E., HIEBERT, E., McGOVERN, R.J., STANSLY, P.A., SCHUSTER, D.J. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomatoes in Florida. **Plant Disease**, v. 77, p. 1181-1184, 1993.
- POOMA, W., PETTY, I.T.D. Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1947-1951, 1996.
- POOMA, W., GILLETTE, W.K., JEFFREY, J.L., PETTY, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. **Virology**, v. 218, p. 264-268, 1996.

- POUR, A.K., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S., GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 6763-6769, 1991.
- POWELL-ABEL, P.A., NELSON, R.S.B., HOFFMANN, N., ROGERS, S.G., FRAYLEY, R.T., BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v. 232, p. 738-743, 1986.
- POWER, A.G. Insect transmission of plant viruses: A constraint on virus variability. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 336-340, 2000.
- QIN, S., WARD, B.M., LAZAROWITZ, S.G. The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9247-9256, 1998.
- RESENDE, R.O., CUPERTINO, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 19-27, 1996.
- REVINGTON, G.N., SUNTER, G., BISARO, D.M. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. **Plant Cell**, v. 1, p. 985-992, 1989.
- REZENDE, E.A., FILGUEIRA, F.A.R., ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., FERNANDES, J.J., GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 424, 1996.
- REZENDE, W.L., MILITÃO-NETO, V., GOULART, L.R., GIOVANINI, M.P., JULIATTI, F.C., FERNANDES, J.J. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 338-339, 1997.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVÍCIUS, L.P., ÁVILA, A.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M., MELLO, R.N., ROCHA, H., ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. **Archives of Virology**, submetido para publicação.
- RIBEIRO, S.G., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., FERNANDES, J.J., FARIA, J.C., LIMA, M.F., GILBERTSON, R.L., ZAMBOLIM, E.M., ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v. 82, p. 830, 1998.

- RIBEIRO, S.G., BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., ÁVILA, A.C., GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8, São Lourenço, MG. **Resumos...** São Lourenço:Sociedade Brasileira de Virologia, 1996. p. 290.
- RIBEIRO, S.G., MELLO, L.V., BOITEUX, L.S., KITAJIMA, E.W., FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 330, 1994.
- RIGDEN, J.E., KRAKE, L.R., REZAIAN, M.A., DRY, I.B. ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. **Virology**, v. 204, p. 847-850, 1994.
- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, v. 95, p. 105-113, 1998.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL, D.R., MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- ROYE, M.E., MCLAUGHLIN, W.A., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. **Plant Disease**, v. 81, p. 1251-1258, 1997.
- ROYE, M.E., WERNECKE, M.E., MCLAUGHLIN, W.A., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P. Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with tomato yellow leaf curl virus. **Plant Pathology**, v. 48, p. 370-378, 1999.
- RUBINSTEIN, G., CZOSNEK, H. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2683-2689, 1997.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-77, 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York:Cold Spring Harbor, 1989.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILHO, J., CAMERO, R., SORIA, C., DÍAZ, J.A., MORIONES, E. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Sr) by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. **Virology**, v.89, p. 1038-1043, 1999.

- SANDERFOOT, A.A., INGHAM, D.J., LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle: The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v. 110, p. 23-33, 1996.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement proteins interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 325-330, 1996.
- SANFORD, J.C., JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance: Deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v. 115, p. 395-405, 1985.
- SANTOS, C.D.G., BEZERRA, I.C., ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. Occurrence of geminivirus in the state of Goiás. **Virus Reviews and Research**, v.3, p. 144, 1998.
- SAUNDERS, K., STANLEY, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. **Virology**, v. 264, p. 142-152, 1999.
- SAUNDERS, K., BEDFORD, I.D., STANLEY, J. Pathogenicity of a natural recombinant associated with *Ageratum* yellow vein diseases: Implications for geminivirus evolution and disease aetiology. **Virology**, v. 282, p. 38-47, 2001.
- SAUNDERS, K., BEDFORD, I.D., BRIDDON, R.W., MARKHAM, P.G., WONG, S.M., STANLEY, J. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 97, p. 6890-6895, 2000.
- SAUNDERS, K., LUCY, A., STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 2325-2330, 1991.
- SCHAFFER, R.L., MILLER, C.G., PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v. 214, p. 330-338, 1995.

- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B., HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminivirus replication proteins. **Journal of Virology**, v.70, p. 6790-6795, 1996.
- SIJEN, T., WELLINK, J., HENDRIKS, J., VERVER, J., VAN KAMMEN, A. Replication of cowpea mosaic virus RNA1 or RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the full-length replicase or movement protein genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p. 340-347, 1995.
- SIMONE, G.W., BROWN, J.K., HIEBERT, E., CULLEN, R.E. New geminivirus epidemic in Florida in tomatoes and peppers. **Phytopathology**, v.80, p. 1063, 1990.
- SMITH, D.R., MAXWELL, D.P. Requirement of the common region of DNA-B and the BL1 open reading frame of bean golden mosaic geminivirus for systemic infection of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 84, p. 133-138, 1994.
- SOUZA-DIAS, J.A.C., YUKI, V.A., RIBEIRO, S.G., RAVAGNANE, V.A. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivírus que infecta batata. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 57, 1996.
- STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v. 206, p. 707-712, 1995.
- STANLEY, J., GAY, M.R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v. 301, p. 260-262, 1983.
- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. **Nature**, v. 305, p. 643-645, 1983.
- STANLEY, J., MARKHAM, P.G., CALLIS, R.J., PINNER, M.S. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. **EMBO Journal**, v. 5, p. 1761-1767, 1986.
- STANLEY, J., TOWNSEND, R., CURSON, S.J. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. **Journal General Virology**, v. 66, p. 1055-1061, 1985.
- SUNTER, G., HARTIZ, M.D., BISARO, D.M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication proteins. **Virology**, v. 195, p. 275-280, 1993.

- SUNTER, G., HARTIZ, M.D., HORMUZDI, S.G., BROUGH, C.L., BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, p. 69-77, 1990.
- TAN, P.H.N., WONG, S.M., WU, M., BEDFORD, I.D., SAUNDERS, K., STANLEY, J. Genome organization of *Ageratum* yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2915-2922, 1995.
- THOTTAPPILLY, G. Plant virus diseases of importance to African agriculture. **Journal of Phytopathology**, v. 134, p. 265-288, 1992.
- TIMMERMANS, M.C.P., DAS, O.P., MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 79-112, 1994.
- TORRES-PACHECO, I., GARZÓN-TIZNADO, J.A., BROWN, J., BECERRA-FLORES, A., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. **Phytopathology**, v.86, p.1186-1192, 1996.
- TORRES-PACHECO, I., GARZÓN-TIZNADO, J.A., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2225-2231, 1993.
- UMAHARAN, P., PADIDAM, M., PHELPS, R.H., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. **Phytopathology**, v. 88, p. 1262-1268, 1998.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J.A., McGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R. (Eds.) **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. New York:Academic Press, 2000.
- VOINNET, O., PINTO, Y.M., BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.96, p. 14147-14152, 1999.
- VON ARNIM, A., STANLEY, J. Inhibition of African cassava mosaic virus systemic infection by a movement protein from the related geminivirus tomato golden mosaic virus. **Virology**, v. 187, p. 555-564, 1992.

- WANG, H.L., SUDARSHANA, M.R., GILBERTSON, R.L., LUCAS, W.J.
Analysis of cell-to-cell and long-distance movement of a bean dwarf mosaic geminivirus-green fluorescent protein reporter in host and nonhost species: Identification of sites of resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 345-355, 1999.
- ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., FERNANDES, J.J., GILBERTSON, R.L., CARRIJO, I.V. A new geminivirus isolated from tomatoes at Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** v. 21, p. 430, 1996.
- ZHOU X.F., LIU Y.L., ROBINSON D.I., HARRISON B.D. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 915-928, 1996.